



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112012009296-0 A2



(22) Data do Depósito: 20/10/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 02/02/2021

(54) **Título:** MÉTODOS PARA DETERMINAR O NÍVEL OU ESTADO DE ATIVAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO ONCOGÊNICA, PARA OTIMIZAR TERAPIA E/OU REDUZIR A TOXICIDADE EM UM SUJEITO TENDO CÂNCER, PARA SELECIONAR UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER ADEQUADO PARA O TRATAMENTO DE UM CÂNCER, PARA IDENTIFICAR A RESPOSTA DE UM CÂNCER AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO CÂNCER, PARA IDENTIFICAR A RESPOSTA DE UM CÂNCER AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER, PARA PREDIZER A RESPOSTA DE UM SUJEITO TENDO CÂNCER AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER, E, PARA DETERMINAR SE UM SUJEITO TENDO CÂNCER É RESISTENTE AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER.

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/50.

(30) **Prioridade Unionista:** 15/09/2010 US 61/383037; 16/02/2010 US 61/305084; 20/10/2009 US 61/253393; 23/04/2010 US 61/327487.

(71) **Depositante(es):** PROMETHEUS LABORATORIES INC..

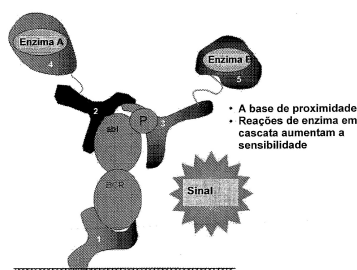
(72) **Inventor(es):** SHARAT SINGH; XINJUN LIU.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2010053386 de 20/10/2010

(87) **Publicação PCT:** WO 2011/050069 de 28/04/2011

(85) **Data da Fase Nacional:** 19/04/2012

(57) **Resumo:** MÉTODOS PARA DETERMINAR O NÍVEL OU ESTADO DE ATIVAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO ONCOGÊNICA, PARA OTIMIZAR TERAPIA E/OU REDUZIR A TOXICIDADE EM UM SUJEITO TENDO CÂNCER, PARA SELECIONAR UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER ADEQUADO PARA O TRATAMENTO DE UM CÂNCER, PARA IDENTIFICAR A RESPOSTA DE UM CÂNCER AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER, PARA PREDIZER A RESPOSTA DE UM SUJEITO TENDO CÂNCER AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER, E, PARA DETERMINAR SE UM SUJEITO TENDO CÂNCER É RESISTENTE AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER. A presente invenção fornece arranjos a base de anticorpo para detectar o estado de ativação e/ou quantidade total de uma ou uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas em uma amostra biológica, tal como sangue total ou tecido tumoral, e métodos de uso destes. Em certos exemplos, o estado de ativação e ou a quantidade total de proteína(s) de fusão oncogênica(s) presente(s) em uma amostra podem ser medidos em combinação com uma ou uma pluralidade de moléculas de transdução de sinal. As composições e métodos da presente invenção apresentam as vantagens de especificidade associada a ensaios imunoabsorventes ligados à enzima, sensibilidade associada a amplificação de sinal, e multiplexação (...).



“MÉTODOS PARA DETERMINAR O NÍVEL OU ESTADO DE ATIVAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO ONCOGÊNICA, PARA OTIMIZAR TERAPIA E/OU REDUZIR A TOXICIDADE EM UM SUJEITO TENDO CÂNCER, PARA SELECIONAR UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER ADEQUADO PARA O TRATAMENTO DE UM CÂNCER, PARA IDENTIFICAR A RESPOSTA DE UM CÂNCER AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER, PARA PREDIZER A RESPOSTA DE UM SUJEITO TENDO CÂNCER AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER, E, PARA DETERMINAR SE UM SUJEITO TENDO CÂNCER É RESISTENTE AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER”

#### **REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS**

O presente pedido reivindica a prioridade do pedido provisório U.S. 61/253.393, depositado em 20 de outubro de 2009, pedido provisório U.S. 61/305.084, depositado em 16 de fevereiro de 2010, pedido provisório U.S. 61/327.487, depositado em 23 de abril de 2010, e pedido provisório U.S. 61/383.037, depositado em 15 de setembro de 2010, cujas revelações são aqui incorporadas pela referência na sua íntegra com todos os propósitos.

#### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

As proteínas de fusão, também conhecidas como proteínas quiméricas, são proteínas criadas por meio da união de dois ou mais genes que codificam originalmente proteínas separadas. A tradução deste gene de fusão resulta em um polipeptídeo simples com propriedades funcionais derivadas de cada uma das proteínas originais. As proteínas mutantes quiméricas ocorrem quando uma mutação em grande escala, tipicamente uma translocação cromossômica, cria uma sequência codificante inédita que contém partes das sequências codificantes de dois genes diferentes. As proteínas de fusão de ocorrência natural são importantes no câncer, onde funcionam como oncoproteínas.

---

A proteína de fusão BCR-ABL é um exemplo bem conhecido de uma proteína de fusão oncogênica. Pode ser considerada como o principal regulador oncogênico de leucemia mielogênica crônica (CML), mas também está associada a leucemia linfoblástica aguda (ALL). De fato, a marca

5 citogenética de CML é o cromossomo Filadélfia (Ph), que resulta na formação do gene de fusão BCR-ABL que codifica uma proteína de 210 kDa. De fato, a proteína de fusão BCR-ABL resultante é uma tirosina quinase ativa que é importante para a patogênese de CML. Embora imatinib (Gleevec<sup>®</sup>) seja atualmente a terapia inicial para pacientes recentemente diagnosticados com

10 CML, cerca de 20-25 % dos pacientes não atingem respostas citogenéticas completas duráveis. Estudos mostraram que a reativação da sinalização de BCR-ABL na presença de tratamento continuado com imatinib é a principal causa de resistência. Na maioria dos pacientes, a reativação resulta das mutações no domínio BCR-ABL quinase que dificulta a ligação de imatinib e

15 leva à indução de resistência ao medicamento. Como tal, a medição da atividade de BCR-ABL é útil na previsão de resposta à terapia com inibidores de tirosina quinase, tal como imatinib, bem como na identificação de pacientes que desenvolvem resistência a tais inibidores.

Até o momento, os métodos disponíveis para detectar

20 atividade de BCR-ABL dependem da medição de CRKL fosforilado (pCRKL), um substrato de BCR-ABL. Por exemplo, La Rosee et al. (Haematologica, 93:765-9 (2008)) descrevem uma análise Western blot de lisados de leucócito total para determinar o nível de pCRKL como um substituto da atividade de BCR-ABL (ver também, Hochhaus et al.,

25 Leukemia, 16:2190-6 (2002); White et al., J. Clin. Oncol, 25:4445-51 (2007)). De maneira similar, Khorashad et al. (Haematologica, 94:8 1-4 (2009)) descreve um método a base de citometria de fluxo de medir o nível de pCRKL para avaliar a atividade de BCR-ABL (ver também, Hamilton et al., Leukemia, 20: 1035-9 (2006)). Entretanto, estes métodos não apresentam a

especificidade e sensibilidade que é exigida para determinar a presença ou nível da atividade de BCR-ABL em uma amostra, em decorrência de serem ensaios de anticorpo simples que dependem da detecção da fosforilação de uma proteína substituta. Dessa maneira, métodos específicos e sensíveis são necessários para detectar a atividade de BCR-ABL, bem como a atividade de outras proteínas de fusão oncogênicas, com propósitos de diagnóstico, prognóstico e terapêutico. A presente invenção satisfaz esta necessidade e fornece vantagens relacionadas igualmente.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece arranjos a base de anticorpo para detectar o estado de ativação e/ou quantidade total de uma ou uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas em uma amostra biológica, tal como sangue total (por exemplo, um lisado preparado a partir de células raras circulantes isoladas ou leucócitos) ou tecido tumoral (por exemplo, um aspirado por agulha fina) e métodos de uso destes. Em certos exemplos, o estado de ativação e/ou quantidade total de proteína(s) de fusão oncogênica(s) presente em uma amostra pode ser medida em combinação com uma ou uma pluralidade de moléculas de transdução de sinal. As composições e métodos da presente invenção apresentam as vantagens de especificidade associados com ensaios imunoabsorventes ligados à enzima, sensibilidade associada a amplificação de sinal e multiplexação de alto rendimento associada a microarranjos.

Em um aspecto, a presente invenção fornece um método para determinar o nível ou estado de ativação de uma proteína de fusão oncogênica, o método compreendendo:

(a) colocar um extrato celular em contato com uma primeira fração de ligação específica para um primeiro domínio de uma primeira proteína de tamanho total, em condições adequadas para transformar a primeira proteína de tamanho total presente no extrato celular em um

---

complexo que compreende a primeira proteína de tamanho total e a primeira fração de ligação, em que o primeiro domínio da primeira proteína de tamanho total não apresenta uma proteína de fusão oncogênica correspondente, que compreende um segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total fundido a um primeiro domínio de uma segunda proteína de tamanho total diferente;

(b) remover o complexo da etapa (a), a partir do extrato celular, para formar um extrato celular desprovido da primeira proteína de tamanho total;

(c) colocar o extrato celular da etapa (b) em contato com uma segunda fração de ligação específica para o segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total, em condições adequadas para transformar a proteína de fusão oncogênica presente no extrato celular em um complexo que compreende a proteína de fusão oncogênica e a segunda fração de ligação; e

(d) determinar o nível ou estado de ativação do complexo da etapa (c), determinando por meio disso o nível ou estado de ativação da proteína de fusão oncogênica.

Em modalidades particulares, determinar o nível ou estado de ativação de uma proteína de fusão oncogênica inclui medir um nível de expressão (por exemplo, concentração) e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica (por exemplo, em um extrato celular).

Em modalidades preferidas, as etapas (c) e (d) do método da presente invenção compreendem um ensaio imunoabsorvente ligado e enzima (ELISA), um ensaio de citometria de fluxo, um ensaio de seleção de rótulo, ou um ensaio de detecção de proximidade dupla da maneira aqui descrita.

Em uma modalidade particular do ensaio de detecção de proximidade dupla, a presente invenção fornece um método para determinar o

---

nível ou estado de ativação de uma proteína de fusão oncogênica, o método compreendendo:

(a) incubar um extrato celular com uma diluição em série de anticorpos de captura específicos para a proteína de fusão oncogênica para formar uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas capturadas, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido, em que a proteína de fusão oncogênica compreende um primeiro domínio que corresponde a uma primeira proteína e um segundo domínio que corresponde a uma segunda proteína diferente, e em que os anticorpos de captura são específicos para o primeiro domínio da proteína de fusão;

(b) incubar a pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas capturadas com pelo menos dois tipos de anticorpos de detecção específicos para o segundo domínio da proteína de fusão oncogênica, para formar uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas capturadas detectáveis, em que os anticorpos de detecção compreendem:

(1) uma pluralidade de anticorpos independentes do estado de ativação marcados com uma fração de facilitação, e

(2) uma pluralidade de anticorpos dependentes do estado de ativação marcados com um primeiro elemento de um par de amplificação de sinal,

em que a fração de facilitação gera um agente de oxidação que canaliza e reage com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal;

(c) incubar a pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas capturadas detectáveis com um segundo elemento do par de amplificação de sinal, para gerar um sinal amplificado, e

(d) detectar o sinal amplificado gerado a partir do primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal.

Em uma outra modalidade particular do ensaio de detecção de proximidade dupla, a presente invenção fornece um método para determinar o

---

nível ou estado de ativação de uma proteína de fusão oncogênica, o método compreendendo:

(a) incubar um extrato celular com uma diluição em série de anticorpos de captura específicos para a proteína de fusão oncogênica para formar uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas capturadas, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido, em que a proteína de fusão oncogênica compreende um primeiro domínio que corresponde a uma primeira proteína e um segundo domínio que corresponde a uma segunda proteína diferente, e em que os anticorpos de captura são específicos para o primeiro domínio da proteína de fusão;

(b) incubar a pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas capturadas com pelo menos dois tipos de anticorpos de detecção para formar uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas capturadas detectáveis, em que os anticorpos de detecção compreendem:

(1) uma pluralidade de anticorpos independentes do estado de ativação marcados com uma fração de facilitação, em que os anticorpos independentes do estado de ativação são específicos para o primeiro domínio da proteína de fusão, e

(2) uma pluralidade de anticorpos dependentes do estado de ativação marcados com um primeiro elemento de um par de amplificação de sinal, em que os anticorpos dependentes do estado de ativação são específicos para o segundo domínio da proteína de fusão,

em que a fração de facilitação gera um agente de oxidação que canaliza e reage com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal;

(c) incubar a pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas capturadas detectáveis com um segundo elemento do par de amplificação de sinal, para gerar um sinal amplificado, e

(d) detectar o sinal amplificado gerado a partir do primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal.

---

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para otimizar a terapia e/ou reduzir a toxicidade em um sujeito com câncer, e que recebe um período de terapia para o tratamento do câncer, o método compreendendo:

- 5 (a) isolar células de câncer após a administração de um medicamento anti-câncer;
- (b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;
- (c) medir um nível de expressão e/ou ativação de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio aqui descrito; e
- 10 (d) comparar o nível medido de expressão e/ou ativação da proteína de fusão oncogênica com um nível de expressão e/ou ativação da proteína de fusão oncogênica, medido em um momento anterior, durante o período da terapia; e
- (e) determinar uma dose subsequente do período da terapia
- 15 para o sujeito, ou se um período da terapia diferente pode ser administrado ao sujeito com base na comparação da etapa (d).

Em certas modalidades, uma ou mais moléculas de transdução de sinal presentes no extrato celular são detectadas, além de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas. Exemplos de moléculas de transdução de

20 sinal incluem, sem limitação, receptor tirosina quinases, não receptor tirosina quinases, componentes da cascata de sinalização de tirosina quinase, e/ou substratos para uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas (por exemplo, substratos BCR-ABL). Em alguns exemplos, as moléculas de transdução de sinal são detectadas usando os métodos aqui descritos, com a exceção de que,

25 dependendo do ensaio, tanto os dois anticorpos (isto é, o anticorpo de captura e o anticorpo de detecção) quanto os três anticorpos (isto é, o anticorpo de captura e ambos os anticorpos de detecção) são direcionados para a mesma proteína. Em outros exemplos, as moléculas de transdução de sinal são detectadas usando qualquer método conhecido pelos versados na técnica. Em

---

modalidades particulares, uma ou mais das moléculas de transdução de sinal presentes no extrato celular são detectadas junto com uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, usando os ensaios (por exemplo, imunoenaios) aqui descritos.

5                   Em certas modalidades, a presente invenção também fornece estojos para realizar os ensaios de detecção de proximidade dupla aqui descritos, compreendendo: (a) uma diluição em série de uma ou uma pluralidade de anticorpos de captura mantidos em um suporte sólido, em que os anticorpos de captura são específicos para um ou mais analitos de interesse  
10 (por exemplo, as proteínas de fusão oncogênicas ou moléculas de transdução de sinal); e (b) uma pluralidade (por exemplo, pelo menos dois tipos) de anticorpos de detecção para cada analito de interesse. Os estojos podem compreender adicionalmente de maneira opcional outros reagentes tais como, por exemplo, o primeiro e o segundo elementos do par de amplificação de  
15 sinal.

Outros objetos, características e vantagens da presente invenção serão evidentes aos versados na técnica a partir da descrição e figuras a seguir.

### **DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS**

20                   A figura 1 mostra uma modalidade do formato de ensaio da presente invenção, que depende da co-localização de dois anticorpos de detecção adicionais ligados com enzimas para subsequentes eventos de formação de canal para cada proteína de fusão oncogênica alvo ligada.

25                   A figura 2 mostra esquematicamente a aplicação dos arranjos da invenção para seleção de medicamento em todo o período de tratamento de câncer.

As figuras 3 A-D mostram várias modalidades do formato de ensaio da presente invenção para detectar expressão e níveis de ativação de proteínas de fusão oncogênicas tal como BCR-ABL.

---

A figura 4 mostra o sinal de BCR-ABL em células K562 após a remoção de BCR livre.

A figura 5 mostra o sinal de BCR em células K562 após a remoção de BCR livre.

5 A figura 6 mostra a detecção de níveis totais e fosforilados de BCR-ABL em células K562.

A figura 7 mostra o nível de fosforilação ("BCR-ABL fosfo") e a quantidade total ("BCR-ABL total") de BCR-ABL detectado em células K562 de leucemia mielogênica crônica humana com ou sem a diminuição de BCR livre usando contas acopladas ao anticorpo C-terminal de BCR.  
10

A figura 8 mostra o sinal de BCR-ABL fosforilado em células K562 com ou sem a remoção de BCR livre usando contas acopladas ao anticorpo C-terminal de BCR. Em particular, a figura 8 A fornece uma comparação de microarranjo do sinal de BCR-ABL fosforilado detectado em lisados de célula K562, com ou sem a remoção de BCR de tamanho total ("Contas não tratadas" = BCR não removida versus "Contas tratadas" = BCR removida com contas que contém um anticorpo específico para a terminação C de BCR de tamanho total conjugado a estas). A figura 8B fornece uma representação gráfica dos dados de microarranjo com unidades de fluorescência relativa (RFU) como uma função do número celular.  
15  
20

A figura 9 mostra o sinal total de BCR-ABL em células K562 com ou sem a remoção de BCR livre, usando contas acopladas ao anticorpo C-terminal de BCR. Em particular, a figura 9A fornece uma comparação de microarranjo do sinal total de BCR-ABL detectado em lisados de célula K562 com ou sem a remoção de BCR de tamanho total ("Contas não tratadas" = BCR não removida versus "Contas tratadas" = BCR removida com contas que contém um anticorpo específico para a terminação C de BCR de tamanho total conjugado a estas). A figura 9B fornece uma representação gráfica dos  
25

---

dados de microarranjo com unidades de fluorescência relativa (RFU) como uma função do número celular.

A figura 10 mostra a remoção de BCR livre de tamanho total a partir de um extrato de células K562, após colocar o extrato celular em contato com contas acopladas ao anticorpo C-terminal de BCR. Em particular, a figura 10A fornece uma comparação de microarranjo do sinal total de BCR detectado em lisados de célula K562 com ou sem a remoção de BCR de tamanho total ("Contas não tratadas" = BCR não removida versus "Contas tratadas" = BCR removida com contas que contém um anticorpo específico para a terminação C de BCR de tamanho total conjugado a estas). A figura 10B fornece uma representação gráfica dos dados de microarranjo com unidades de fluorescência relativa (RFU) como uma função do número celular.

A figura 11 mostra que as proteínas BCR e ABL livres de tamanho total, mas não a proteína de fusão BCR-ABL, estão presentes nas células brancas do sangue (WBCs).

A figura 12 mostra que a BCR livre de tamanho total presente em WBCs inibiu o sinal de BCR-ABL fosfo em extratos de célula K562, quando tais extratos de célula K562 foram maiores com os extratos de WBC.

A figura 13 mostra o sinal de BCR-ABL total em células K562 maior com os extratos de WBC após a remoção de BCR livre, usando contas acopladas ao anticorpo C-terminal de BCR. Em particular, A figura 13A mostra que o sinal de BCR livre foi saturado quando os extratos de célula K562 foram maiores com os extratos de WBC. Após o tratamento com contas acopladas ao anticorpo C-terminal de BCR, a BCR livre foi removida. A figura 13B mostra que o sinal de BCR-ABL não foi alterado com ou sem tratamento com contas no mesmo experimento.

A figura 14 mostra que o inibidor de BCR-ABL, imatinib (Gleevec<sup>®</sup>), inibiu dose-dependentemente a ativação (isto é, fosforilação),

---

mas não a expressão (isto é, níveis totais), da proteína BCR-ABL em células K562.

A figura 15 mostra que o inibidor de BCR-ABL, nilotinib (Tasigna<sup>®</sup>), inibiu dose-dependentemente a ativação (isto é, fosforilação), mas não a expressão (isto é, níveis totais), de proteína BCR-ABL em células K562.

A figura 16 mostra que o inibidor de BCR-ABL, dasatinib (Sprycel<sup>®</sup>), inibiu dose-dependentemente a ativação (isto é, fosforilação), mas não a expressão (isto é, níveis totais), de proteína BCR-ABL em células K562.

A figura 17 mostra que CRKL é tanto presente quanto ativado (isto é, fosforilado) em células K562.

A figura 18 mostra que CRKL está presente em células humanas de carcinoma epidermóide A431 e é ativada (isto é, fosforilada) mediante tratamento de EGF.

A figura 19 mostra que CRKL está presente em células de tumor epitelial de mama ductal humana T47D, mas não está ativada (isto é, fosforilada) mediante tratamento com EGF.

A figura 20 mostra que CRKL está presente em células T47D e é ativada (isto é, fosforilada) em baixos níveis mediante tratamento com heregulina (HRG).

A figura 21 mostra que CRKL está presente em células humanas de adenocarcinoma de mama MCF-7 e é ativada (isto é, fosforilada) em baixos níveis mediante tratamento com heregulina (HRG).

A figura 22 ilustra a presença de CRKL ativada (isto é, fosforilada) nas células brancas do sangue (WBCs) de doadores diferentes.

A figura 23 ilustra que JAK2 é ativada (isto é, fosforilada) em células K562 e células A431.

---

A figura 24 ilustra que BCR-ABL fosforilada pode ser detectada e medida em lisados celulares preparados a partir de células K562 isoladas do sangue, usando contas magnéticas anti-CD45.

5 A figura 25 ilustra que os níveis totais de BCR-ABL não foram alterados quando um anticorpo direcionado à terminação C de BCR de tamanho total natural (em que o domínio C-terminal não está presente em BCR-ABL) foi reconhecido no mesmo dispositivo da mesma peça, como um anticorpo direcionado à região N-terminal de BCR-ABL.

10 A figura 26 ilustra que sinal de BCR livre natural detectado com um anticorpo de BCR específico N-terminal foi reduzido quando um anticorpo direcionado às terminações C de BCR natural foi reconhecido no mesmo dispositivo da mesma peça.

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

### **I. Introdução**

15 As malignidades hematológicas são os tipos de câncer que afetam o sangue, medula óssea e linfonodos. Como as três são intimamente conectadas por meio do sistema imune, uma doença que afeta uma das três frequentemente afetará as outras também. Por exemplo, embora o linfoma seja tecnicamente uma doença dos linfonodos, este frequentemente se  
20 dispersa para a medula óssea e o sangue. As translocações cromossômicas, que criam proteínas de fusão com sequências codificantes inéditas que contêm partes das sequências codificantes de dois genes diferentes, são uma causa comum destas doenças, mas são uma causa menos comum de tumores sólidos. Como tal, é importante identificar a presença e/ou atividade de  
25 proteínas de fusão oncogênicas associadas às malignidades hematológicas, a fim de fornecer o prognóstico e tratamento apropriados para pacientes com estes tipos de câncer.

Por exemplo, a proteína de fusão BCR-ABL está associada com leucemia mielogênica crônica (CML), bem como leucemia linfoblástica

---

aguda (ALL). Em particular, a proteína BCR-ABL é uma tirosina quinase ativa que é importante para a patogênese do câncer. Embora imatinib (Gleevec®) seja atualmente a terapia inicial para pacientes recentemente diagnosticados com CML, cerca de 20-25 % dos pacientes não atingem respostas citogenéticas completas duráveis. Estudos mostraram que a reativação da atividade de BCR-ABL quinase, na presença de tratamento continuado com imatinib, é a principal causa de resistência. Como tal, a medição da atividade de BCR-ABL é útil na previsão de resposta à terapia com inibidores de tirosina quinase, tal como imatinib, bem como na identificação de pacientes que desenvolvem resistência a tais inibidores.

A presente invenção fornece métodos para detectar o estado de ativação e/ou a quantidade total de uma ou uma pluralidade de proteínas de fusão (sozinhas ou em combinação com uma ou uma pluralidade de moléculas de transdução de sinal) em células isoladas usando um sistema de ensaio de arranjo a base de anticorpo. Os extratos celulares preparados a partir de leucócitos isolados, células circulantes, ou outros tipos celulares são particularmente usados nos métodos aqui descritos. Em algumas modalidades, os ensaios multiplex de alto rendimento da presente invenção podem detectar o estado de ativação de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, e/ou moléculas de transdução de sinal, no nível celular único. De fato, as moléculas de transdução de sinal, tal como EGFR, podem ser detectadas com uma sensibilidade de cerca de 100 zeptomols e uma faixa dinâmica linear de cerca de 100 zeptomols a cerca de 100 femtomols. Como tal, a detecção de célula única do estado de ativação de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, e/ou moléculas de transdução de sinal, facilita o prognóstico e diagnóstico de câncer, bem como a determinação de terapias personalizadas e alvejadas.

A figura 1 ilustra um ensaio exemplar de detecção de proximidade dupla da presente invenção, no qual uma proteína de fusão

---

oncogênica, tal como BCR-ABL, está ligada a um anticorpo de captura e dois anticorpos de detecção (isto é, um anticorpo independente do estado de ativação e um anticorpo dependente do estado de ativação). O anticorpo de captura 1 se liga à porção de BCR da proteína de fusão independente de seu estado de ativação. Embora o anticorpo independente do estado de ativação 2 se ligue à porção ABL da proteína de fusão independente de seu estado de ativação, o anticorpo dependente do estado de ativação 3 se liga à porção ABL da proteína de fusão dependente de seu estado de ativação (por exemplo, o anticorpo dependente do estado de ativação se ligará apenas à forma ativada de BCR-ABL com um resíduo fosforilado). O anticorpo independente do estado de ativação é marcado com uma fração de facilitação 4 ("Enzima A"), e o anticorpo dependente do estado de ativação é marcado com um primeiro elemento de um par de amplificação de sinal 5 ("Enzima B"). A ligação de ambos os anticorpos de detecção na porção ABL da proteína de fusão introduz a fração de facilitação em proximidade suficiente com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal, de maneira tal que um sinal gerado pela fração de facilitação possa canalizar no primeiro elemento do par de amplificação de sinal, resultando na geração um sinal detectável e/ou amplificável. Vários métodos para canalizar por proximidade são aqui descritos e são também conhecidos na técnica incluindo, mas sem limitação, FRET, FRET com fluorescência solucionada com o tempo, LOCI, etc. Uma vantagem de canalizar por proximidade, da maneira usada nos métodos da presente invenção, é que um sinal detectável simples é gerado apenas para aqueles analitos (por exemplo, proteínas de fusão ou moléculas de transdução de sinal) que se ligaram a todos os três anticorpos, resultando em melhor especificidade do ensaio, menos fundamento e detecção simplificada.

Da maneira aqui explicada em maiores detalhes, para avaliar as terapias anti-câncer potenciais para um paciente individual, as células isoladas podem ser incubadas com um ou mais medicamentos anti-câncer em

---

doses variadas. A estimulação do fator de crescimento pode então ser realizada por uns cinco minutos (por exemplo, cerca de 1-5 minutos) ou por várias horas (por exemplo, cerca de 1-6 horas). A ativação diferencial de vias de sinalização com e sem medicamentos anti-câncer pode auxiliar na seleção de uma terapia adequada para o câncer, em dose adequada para cada paciente individual. As células também podem ser isoladas a partir de um paciente durante o tratamento com medicamento anti-câncer, e estimuladas com um ou mais fatores de crescimento para determinar se uma mudança na terapia pode ser implementada. Como tal, as figura 2 mostra que os métodos da presente invenção auxiliam vantajosamente o médico em fornecer o medicamento anti-câncer correto, na dose correta, no tempo correto, para cada paciente.

## II. Definições

Da maneira aqui usada, os termos a seguir apresentam os significados atribuídos a eles, a menos que de outra forma especificada.

O termo "câncer" inclui qualquer elemento de uma classe de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células anormais. O termo inclui todos os cânceres e condições neoplásicas conhecidas, quer sejam caracterizados como malignos, benignos, de tecido mole ou sólidos, e cânceres de todos os estágios e graus, incluindo cânceres pré e pós-metastáticos. Os exemplos não limitantes de diferentes tipos de câncer incluem malignidades hematológicas (por exemplo, leucemia, linfoma), sarcoma osteogênicos (por exemplo, sarcoma de Ewing), sarcomas de tecido mole (por exemplo, dermatofibrossarcoma protuberante (DFSP), rabdomiossarcoma), outras malignidades de tecido mole, carcinomas papilares da tireóide, câncer de próstata, câncer gástrico (por exemplo, estômago), câncer de mama, câncer de pulmão (por exemplo, câncer de pulmão de células não pequenas), cânceres digestivos e gastrointestinais (por exemplo, câncer colorretal, tumores estomais gastrointestinais, tumores carcinóides gastrointestinais, câncer do cólon, câncer retal, câncer anal,

---

câncer do duto biliar e câncer do intestino delgado), câncer esofágico, câncer da vesícula biliar, câncer hepático, câncer pancreático, câncer de apêndice, câncer ovariano, câncer renal (por exemplo, carcinoma de célula renal), câncer do sistema nervoso central, câncer de pele, coriocarcinomas e cânceres de cabeça e pescoço. Da maneira aqui usada, um "tumor" compreende uma ou mais células cancerosas.

Uma "malignidade hematológica" inclui qualquer tipo de câncer que afeta o sangue, medula óssea e/ou linfonodos. Exemplos de malignidades hematológicas incluem, mas sem limitação, leucemia, linfoma e mieloma múltiplo. Exemplos não limitantes de diferentes tipos de leucemia incluem leucemia mielogênica crônica (CML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia mielogênica aguda (AML) e leucemia linfocítica granular grande. Os subtipos de CML incluem, por exemplo, leucemia monocítica crônica. Os subtipos de ALL incluem, por exemplo, precursor de leucemia linfoblástica aguda de célula B, leucemia linfoblástica aguda de pró-célula B, precursor de leucemia linfoblástica aguda de célula T e leucemia bifenotípica aguda. Os subtipos de CLL incluem, por exemplo, leucemia pró-linfocítica de célula B. Os subtipos de AML incluem, por exemplo, leucemia pró-mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda e leucemia megacarioblástica aguda. Os exemplos de diferentes tipos de linfoma incluem, mas sem limitação, linfoma de Hodgkin (quatro subtipos) e linfoma não Hodgkin, tais como, por exemplo, linfoma linfocítico pequeno (SLL), linfoma de célula B grande e difuso (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma de célula do Manto (MCL), leucemia de células pilosas (HCL), linfoma de zona marginal (MZL), linfoma de Burkitt (BL), distúrbio linfoproliferativo pós-transplante (PTLD), leucemia pró-linfocítica de célula T (T-PLL), leucemia pró-linfocítica de célula B (B-PLL), macroglobulinemia de Waldenstrom (também conhecida como linfoma linfoplasmacítico) e outros linfomas de NK ou célula T.

O termo "analito" inclui qualquer molécula de interesse, tipicamente uma macromolécula tal como um polipeptídeo, cuja presença, quantidade e/ou identidade são determinadas. Em certos exemplos, o analito é um componente celular de uma célula cancerosa, preferivelmente uma proteína de fusão oncogênica ou uma molécula de transdução de sinal.

O termo "transformar" ou "transformação" inclui uma mudança física e/ou química de um analito ou amostra para extrair o analito, ou mudar ou modificar o analito da maneira aqui definida. Da maneira aqui usada, uma extração, uma manipulação, uma precipitação química, um ELISA, uma complexação, uma imuno-extração, uma modificação física ou química do analito ou amostra para medir um nível ou concentração ou estado de ativação de um analito constituem todos uma transformação. Em outras palavras, contanto que o analito ou a amostra não seja idêntico antes e após a etapa de transformação, a mudança ou modificação é uma transformação.

Da maneira aqui usada, pretende-se que o termo "diluições em série" inclua uma série de concentrações descendentes de uma amostra particular (por exemplo, lisado celular) ou reagente (por exemplo, anticorpo). Uma diluição em série é produzida tipicamente por um processo de misturar uma quantidade medida de uma concentração inicial de uma amostra, ou reagente, com um diluente (por exemplo, tampão de diluição) para criar uma concentração menor da amostra ou reagente, e repetir o processo por vezes suficientes para obter o número desejado de diluições em série. A amostra ou reagente pode ser diluído em série pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 500, ou 1.000 vezes para produzir uma diluição em série compreendendo pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 concentrações descendentes da amostra ou reagente. Por exemplo, uma diluição em série, compreendendo uma diluição em série de 2 vezes de um reagente de anticorpo de captura em uma concentração inicial de 1 mg/mL, pode ser produzida misturando uma

---

quantidade da concentração inicial de anticorpo de captura com uma quantidade igual de um tampão de diluição para criar uma concentração do anticorpo de captura de 0,5 mg/mL, e repetir o processo para obter concentrações do anticorpo de captura de 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,0325 mg/mL, etc.

O termo "faixa dinâmica superior", da maneira aqui usada, refere-se à capacidade de um ensaio detectar um analito específico em apenas uma célula ou em muitos milhares de células. Por exemplo, os imunoenaios aqui descritos possuem faixa dinâmica superior em decorrência detectarem vantajosamente uma proteína de fusão oncogênica particular, ou molécula de transdução de sinal de interesse, em cerca de 1-10.000 células (por exemplo, cerca de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1.000, 2.500, 5.000, 7.500 ou 10.000 células) usando uma diluição em série de concentrações de anticorpo de captura.

O termo "proteína de fusão" ou "proteína quimérica" inclui uma proteína criada por meio da união de dois ou mais genes que codificam originalmente proteínas separadas. Tais fusões de gene são geradas tipicamente quando uma translocação cromossômica substitui os éxons terminais de um gene por éxons intactos de um segundo gene. Isto cria um gene único que pode ser transcrito, unido e traduzido para produzir uma proteína de fusão funcional. Em modalidades particulares, a proteína de fusão é uma proteína de fusão oncogênica, isto é, uma proteína de fusão envolvida na oncogênese. Os exemplos de proteínas de fusão oncogênicas incluem, mas sem limitação, BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RAR $\alpha$ -PML, IREL-URG, CBF $\beta$ -MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-C $\alpha$ 1, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG e TPR-MET.

O termo "molécula de transdução de sinal" ou "transdutor de sinal" inclui proteínas e outras moléculas que realizam o processo no qual uma célula converte um sinal extracelular ou estímulos em uma resposta, que envolvem tipicamente sequências ordenadas de reações bioquímicas dentro da

5 célula. Os exemplos de moléculas de transdução de sinal incluem, mas sem limitação, receptor tirosina quinases tais como EGFR (por exemplo, EGFR/HER-1 /ErbB1, HER-2/Neu/ErbB 2, HER-3/ErbB3, HER-4/ErbB4), VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-1/KDR, VEGFR-3/FLT-4, FLT-3/FLK-2, PDGFR (por exemplo, PDGFRA, PDGFRB), c-Met, c-KIT/SCFR, INSR

10 (receptor de insulina), IGF-IR, IGF-IIR, IRR (receptor relacionado ao receptor de insulina), CSF-1R, FGFR1-4, HGFR 1-2, CCK4, TRK A-C, MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, V-caderina, LTK (tirosina quinase de leucócito), ALK (quinase do linfoma anaplásico), ROR 1-2, MUSK, AATYK

15 1-3, RTK 106, e formas truncadas do receptor tirosina quinases tal como p95ErbB2; receptor não tirosina quinases tais como Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, e LIMK; componentes da cascata de sinalização de tirosina quinase tais como Akt, MAPK/ERK, MEK, RAF, PLA2, MEKK, JNKK, INK, p38, Shc (p66), PI3K, Ras (por exemplo, K-Ras,

20 N-Ras, H-Ras), Rho, Rac1, Cdc42, PLC, PKC, p70 S6 quinase, p53, ciclina D1, STAT1, STAT3, PIP2, PIP3, PDK, mTOR, BAD, p21, p27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, PTEN, RSK 1-3, INK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67 e paxilina; receptores do hormônio nuclear tais como receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor de andrógeno, receptor de glicocorticóide, receptor de mineralocorticóide, receptor de vitamina A,

25 receptor de vitamina D, receptor retinóide, receptor do hormônio tireóide e receptores órfãos; co-ativadores e repressores do receptor nuclear e combinações dos mesmos.

---

O termo "amostra", da maneira aqui usada, inclui qualquer espécime biológico obtido de um paciente. As amostras incluem, sem limitação, sangue total, plasma, soro, fluido do lavado ductal, aspirado de mama, linfa (por exemplo, células tumorais disseminadas do linfonodo), aspirado de medula óssea, saliva, urina, excremento (isto é, fezes), escarro, fluido do lavado brônquico, lágrimas, aspirado por agulha fina (por exemplo, coletado por aspiração por agulha fina periareolar aleatória), qualquer outro fluido corporal, uma amostra tecidual (por exemplo, tecido tumoral) tal como uma biópsia de um tumor (por exemplo, biópsia por agulha) ou um linfonodo (por exemplo, biópsia de linfonodo sentinela), e extratos celulares destes. Em algumas modalidades, a amostra é sangue total ou um componente fracional deste, tais como plasma, soro, células vermelhas do sangue, leucócitos tais como células mononucleares do sangue periférico e/ou células raras circulantes. Em modalidades particulares, a amostra é obtida isolando leucócitos ou células circulantes de um tumor sólido a partir do sangue total, ou uma fração celular deste, usando qualquer técnica conhecida na tecnologia. Em outras modalidades, a amostra é uma amostra de tecido tumoral inserido em parafina e fixo com formalina (FFPE), por exemplo, de um tumor sólido.

Da maneira aqui usada, o termo "células circulantes" compreende células extratumorais que realizaram tanto metástase quanto micrometástase a partir de um tumor sólido. Exemplos de células circulantes incluem, mas sem limitação, células tumorais circulantes, células tronco cancerosas e/ou células que são migratórias para o tumor (por exemplo, células progenitoras endoteliais circulantes, células endoteliais circulantes, células mielóides pró-angiogênicas circulantes, células dendríticas circulantes, etc.).

Uma "biópsia" refere-se ao processo de remover uma amostra tecidual para avaliação de diagnóstico ou prognóstico, e ao próprio espécime tecidual. Qualquer técnica de biópsia conhecida na tecnologia pode ser aplicada aos métodos e composições da presente invenção. A técnica de

---

biópsia aplicada dependerá em geral do tipo de tecido avaliado e o do tamanho e tipo do tumor (isto é, sólidos ou suspensos (isto é, sangue ou ascite)), entre outros fatores. As técnicas representativas de biópsia incluem biópsia excisional, biópsia incisional, biópsia por agulha (por exemplo, 5 biópsia do coração por agulha, biópsia por aspiração com agulha fina, etc.), biópsia cirúrgica e biópsia da medula óssea. As técnicas de biópsia são discutidas, por exemplo, em Harrison 's Principles of Internal Medicine, Kasper, et al., eds., 16ª ed., 2005, capítulo 70, e em toda a parte V. Os versados na técnica entenderão que técnicas de biópsia podem ser realizadas 10 para identificar células cancerosas e/ou pré-cancerosas em uma dada amostra tecidual.

O termo "sujeito", ou "paciente", ou "indivíduo", inclui tipicamente humanos, mas também pode incluir outros animais tais como, por exemplo, outros primatas, roedores, caninos, felinos, equinos, ovinos, 15 porcinos e similares.

Um "arranjo" ou "microarranjo" compreende um conjunto distinto e/ou diluição em série de anticorpos de captura imobilizados ou mantidos em um suporte sólido tal como, por exemplo, vidro (por exemplo, uma lâmina de vidro), plástico, chipes, pinos, filtros, contas (por exemplo, 20 contas magnéticas, contas de poliestireno, etc.), papel, membrana (por exemplo, náilon, nitrocelulose, fluoreto de polivinilideno (PVDF), etc.), feixes de fibras, ou qualquer outro substrato adequado. Os anticorpos de captura são em geral imobilizados ou mantidos no suporte sólido por meio de interações covalentes ou não covalentes (por exemplo, ligações iônicas, 25 interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, ligações dipolo-dipolo). Em certos exemplos, os anticorpos de captura compreendem rótulos de captura que interagem com agentes de captura ligados no suporte sólido. Os arranjos usados nos ensaios da presente invenção compreendem tipicamente uma pluralidade de diferentes anticorpos

---

de captura e/ou concentrações de anticorpo de captura que são acoplados na superfície de um suporte sólido em diferentes locais conhecidos/endereçáveis.

Pretende-se que o termo "anticorpo de captura" inclua um anticorpo imobilizado que é específico para (isto é, liga-se, é ligado por, ou forma um complexo com) um ou mais analitos de interesse em uma amostra, tal como um extrato celular de leucócitos ou células raras circulantes. Em modalidades preferidas, o anticorpo de captura é mantido em um suporte sólido em um arranjo. Os anticorpos de captura adequados para imobilizar qualquer de uma variedade de proteínas de fusão oncogênicas, ou moléculas de transdução de sinal, em um suporte sólido são disponíveis a partir da Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO), e BD Biosciences (San Jose, CA).

O termo "anticorpo de detecção", da maneira aqui usada, inclui um anticorpo compreendendo uma marca detectável que é específica para (isto é, liga-se, é ligado por, ou forma um complexo com) um ou mais analitos de interesse em uma amostra. O termo também inclui um anticorpo que é específico para um ou mais analitos de interesse, em que o anticorpo pode ser ligado por uma outra espécie que compreende uma marca detectável. Exemplos de marcas detectáveis incluem, mas sem limitação, marcas de biotina/estreptavidina, marcas de ácido nucleico (por exemplo, oligonucleotídeo), marcas quimicamente reativas, marcas fluorescentes, marcas enzimáticas, marcas radioativas e combinações destas. Os anticorpos de detecção adequados para detectar o estado de ativação e/ou quantidade total de qualquer de uma variedade de proteínas de fusão oncogênicas, ou moléculas de transdução de sinal, são disponíveis a partir de Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont,

---

CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO), e BD Biosciences (San Jose, CA). Como um exemplo não limitante, os anticorpos fosfo-específicos contra várias formas fosforiladas de moléculas de transdução de sinal, tais como EGFR, c-KIT, c-Src, FLK-1, PDGFRA, PDGFRB, Akt, MAPK, PTEN, Raf, e MEK, são disponíveis a partir de Santa Cruz Biotechnology.

O termo "anticorpo dependente do estado de ativação" inclui um anticorpo de detecção que é específico para (isto é, liga-se, é ligado por, ou forma um complexo com) um estado de ativação particular de um ou mais analitos de interesse em uma amostra. Em modalidades preferidas, o anticorpo dependente do estado de ativação detecta a fosforilação, ubiquitinação, e/ou estado de complexação de um ou mais analitos, tal como uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas ou moléculas de transdução de sinal. Em algumas modalidades, a fosforilação do domínio ABL quinase da proteína de fusão BCR-ABL é detectada usando um anticorpo dependente do estado de ativação. Em outras modalidades, a fosforilação de elementos da família EGFR do receptor tirosina quinases, e/ou a formação de complexos heterodiméricos entre os elementos da família EGFR é detectada usando os anticorpos dependentes do estado de ativação.

Os exemplos não limitantes de estados de ativação de proteínas de fusão oncogênicas que são adequados para detecção com anticorpos dependentes do estado de ativação incluem formas fosforiladas de BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RAR $\alpha$ -PML, IREL-URG, CBF/5-MYH11, AML1 -MTG8, EWS-FLI, LYT-10-Ca1d, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL- AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG e TPR-MET. Os exemplos de estados de ativação (listados entre parênteses) de moléculas de transdução de sinal que são adequados para detecção com anticorpos dependentes do estado de

---

ativação incluem, mas sem limitação, EGFR (EGFRvIII, fosforilado (p-) EGFR, EGFR: Shc, ubiquitinado (u-) EGFR, p-EGFRvIII); ErbB2 (p95 truncado (Tr)-ErbB2, p-ErbB2, p95:Tr-p-ErbB2, HER-2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:EGFR, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4); ErbB3 (p-ErbB3, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc); ErbB4 (p-ErbB4, ErbB4:Shc); c-Met (complexo p-c-Met ou c-Met/HGF), ER (p-ER (S118, S167)); IGF-1R (p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K); INSR (p-INSR); KIT (p-KIT); FLT3 (p-FLT3); HGFR1 (p-HGFR1); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); PDGFRa (p-PDGFRa); PDGFRP (p-PDGFRP); VEGFR1 (p-VEGFR1, VEGFRLPLCg, VEGFR1:Src); VEGFR2 (p-VEGFR2, VEGFR2:PLCy, VEGFR2:Src, VEGFR2: sulfato de heparina, VEGFR2:VE-caderina); VEGFR3 (p-VEGFR3); FGFR1 (p-FGFR1); FGFR2 (p-FGFR2); FGFR3 (p-FGFR3); FGFR4 (p-FGFR4); Tiel (p-Tiel); Tie2 (p-Tie2); EphA (p-EphA); EphB (p-EphB); NFkB e/ou IKB (p-IK (S32), p-NFkB (S536), p-P65:IKBa); Akt (p-Akt (T308, S473)); PTEN (p-PTEN); Bad (p-Bad (SI 12, S136), Bad: 14-3-3); mTor (p-mTor (S2448)); p70S6K (p-p70S6K (T229, T389)); Mek (p-Mek (S217, S221)); Erk (p-Erk (T202, Y204)); Rsk-1 (p-Rsk-1 (T357, S363)); Jnk (p-Jnk (T183, Y185)); P38 (p-P38 (T180, Y182)); Stat3 (p-Stat-3 (Y705, S727)); Fak (p-Fak (Y576)); Rb (p-Rb (S249, T252, S780)); Ki67; p53 (p-p53 (S392, S20)); CREB (p-CREB (SI 33)); c-Jun (p-c-Jun (S63)); cSrc (p-cSrc (Y416)); e paxilina (p-paxilina (Y118)).

O termo "anticorpo independente do estado de ativação" inclui um anticorpo de detecção que é específico para (isto é, liga-se, é ligado por, ou forma um complexo com) um ou mais analitos de interesse em uma amostra, independente de seu estado de ativação. Por exemplo, o anticorpo independente do estado de ativação pode detectar tanto as formas fosforiladas quanto não fosforiladas de um ou mais analitos, tal como uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas ou moléculas de transdução de sinal.

O termo "ácido nucleico" ou "polinucleotídeo" inclui desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos, e polímeros destes, tanto na forma de fita simples quanto fita dupla tal como, por exemplo, DNA e RNA. Os ácidos nucleicos incluem ácidos nucleicos que contêm análogos de nucleotídeo conhecidos, ou resíduos ou ligações de parte principal modificados, que são sintéticos, de ocorrência natural e de ocorrência não natural, e que apresentam propriedades de ligação similares com o ácido nucleico de referência. Os exemplos de tais análogos incluem, sem limitação, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, quirais-metil fosfonatos, 2'-O-metil ribonucleotídeos e ácidos nucleicos peptídicos (PNAs). A menos que especificamente limitado, o termo inclui ácidos nucleicos que contêm análogos conhecidos de nucleotídeos naturais que apresentam propriedades de ligação similares com o ácido nucleico de referência. A menos que de outra forma indicada, uma sequência particular de ácido nucleico também inclui, de maneira implícita, variantes conservativamente modificados deste e sequências complementares, bem como a sequência explicitamente indicada.

O termo "oligonucleotídeo" refere-se a um oligômero de fita simples ou polímero de RNA, DNA, híbrido RNA/DNA e/ou um mimético destes. Em certos exemplos, os oligonucleotídeos são compostos de bases nitrogenadas de ocorrência natural (isto é, não modificadas), açúcares e ligações entre os nucleosídeos (parte principal). Em certos outros exemplos, os oligonucleotídeos compreendem bases nitrogenadas modificadas, açúcares e/ou ligações entre nucleosídeos.

Da maneira aqui usada, o termo "motivo de pareamento imperfeito" ou "região de pareamento imperfeito" refere-se a uma porção de um oligonucleotídeo que não apresenta 100 % de complementaridade com sua sequência complementar. Um oligonucleotídeo pode apresentar pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, ou mais regiões de pareamento imperfeito. As regiões de pareamento imperfeito podem ser contíguas ou podem ser separadas

---

por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou mais nucleotídeos. Os motivos ou regiões de pareamento imperfeito podem compreender um nucleotídeo único ou podem compreender dois, três, quatro, cinco, ou mais nucleotídeos.

A frase "condições de hibridização restritiva" refere-se às condições nas quais um oligonucleotídeo hibridizará em sua sequência complementar, mas não em outras sequências. As condições restritivas são dependentes de sequência e serão diferentes em diferentes circunstâncias. As sequências mais longas hibridizam especificamente em temperaturas mais elevadas. Um roteiro extensivo para a hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Em geral, seleciona-se as condições restritivas para ficarem cerca de 5-10 °C menores que o ponto de fusão térmico ( $T_m$ ) para a sequência específica em um pH de concentração iônica definida.  $T_m$  é a temperatura (em concentração iônica definida, pH e concentração de ácido nucleico) na qual 50 % das sondas complementares ao alvo hibridizam na sequência alvo em equilíbrio (como as sequências alvo estão presentes em excesso, em  $T_m$ , 50 % das sondas são ocupadas em equilíbrio). As condições restritivas também podem ser atingidas com a adição de agentes desestabilizantes tal como formamida. Para hibridização seletiva ou específica, um sinal positivo apresenta pelo menos duas vezes a hibridização do tipo *background*, preferivelmente 10 vezes a hibridização do tipo *background*.

Os termos "substancialmente idêntica" ou "identidade substancial", no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que são as mesmas, ou apresentam um percentual específico de nucleotídeos que são os mesmos (isto é, pelo menos cerca de 60 %, preferivelmente pelo menos cerca de 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, ou 95 % de identidade com uma região específica) quando

---

comparados e alinhados para correspondência máxima com uma janela de comparação, ou região determinada, medida usando um algoritmo de sequência comparação ou por alinhamento manual e inspeção visual. Esta definição, quando indicada pelo contexto, também refere-se analogamente ao complemento de uma sequência. Preferivelmente, a identidade substancial existe em uma região que apresenta pelo menos cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, ou 100 nucleotídeos em tamanho.

O termo "inibidor de tirosina quinase" inclui qualquer de uma variedade de agentes terapêuticos ou medicamentos, que agem como inibidores seletivos ou não seletivos de receptor e/ou não receptor de tirosina quinases. Sem ficar preso a nenhuma teoria em particular, os inibidores de tirosina quinase inibem em geral o alvo de tirosina quinases se ligando no sítio de ligação de ATP da enzima. Exemplos de inibidores de tirosina quinase incluem, mas sem limitação, imatinib (Gleevec®; STI571), nilotinib (Tasigna®), dasatinib (Sprycel®), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®; SU11248), erlotinib (Tarceva®; OSI-1774), lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), leflunomida (SU101), vandetanib (Zactima™; ZD6474), derivados destes, análogos destes e combinações dos mesmos. Os inibidores adicionais de tirosina quinase adequados para uso na presente invenção são descritos em, por exemplo, patentes U.S. 5.618.829, 5.639.757, 5.728.868, 5.804.396, 6.100.254, 6.127.374, 6.245.759, 6.306.874, 6.313.138, 6.316.444, 6.329.380, 6.344.459, 6.420.382, 6.479.512, 6.498.165, 6.544.988, 6.562.818, 6.586.423, 6.586.424, 6.740.665, 6.794.393, 6.875.767, 6.927.293 e 6.958.340. Os versados na técnica conhecerão outros inibidores de tirosina quinase adequados para uso na presente invenção. Em certos exemplos, o inibidor de tirosina quinase é administrado em uma forma farmacêuticamente aceitável incluindo, sem limitação, um álcali ou sal de metal alcalino terroso tal como um sal de

alumínio, cálcio, lítio, magnésio, potássio, sódio ou zinco; um sal de amônio tal como uma amina terciária ou sal de amônio quaternário, e um sal ácido tal como um sal de succinato, tartarato, bitartarato, dicloridrato, salicilato, hemisuccinato, citrato, isocitrato, malato, maleato, mesilato, cloridrato, hidrobrometo, fosfato, acetato, carbamato, sulfato, nitrato, formato, lactato, gluconato, glucuronato, piruvato, oxalacetato, fumarato, propionato, aspartato, glutamato ou benzoato.

O termo "incubar" é usado como sinônimo de "colocar em contato" e "expor" e não implica qualquer período específico ou exigências de temperatura, a menos que de outra forma indicada.

Os termos "resposta citogenética completa", "remissão citogenética completa", "CCyR" e "CCgR" incluem os critérios clinicamente aceitos, definidos para estar na ausência de células positivas para cromossomo Filadélfia em metáfase, entre uma população de pelo menos 20 células em metáfase, da maneira determinada por bandeamento cromossômico de células isoladas de medula óssea. Em certos exemplos, quando a metáfase de células isoladas da medula óssea não pode ser obtida ou avaliada por bandeamento cromossômico, o termo pode ser definido como a presença de  $< 1\%$  de núcleos positivos para BCR-ABL, a partir daqueles de pelo menos 200 núcleos classificados da maneira determinada por hibridização *in situ* fluorescente de interfase (FISH) de células do sangue. O FISH em interfase pode ser realizado, por exemplo, com extra-sinal BCR-ABL, dupla cor, dupla fusão, ou sondas de hibridização *in situ*. Para descrições adicionais destes termos, ver, por exemplo, O'Brien et al., N. Engl. J. Med., 348:994-1004 (2003); Hughes et al., N. Eng.U. Med., 349: 1423-1432 (2003); e Bacarani et al., J. Clin. Oncol, 27:6041-6051 (2009).

Uma "resposta molecular principal", "remissão molecular principal" ou "MMR" é atingida quando o nível de uma proteína de fusão oncogênica, tal como BCR-ABL, diminui em pelo menos cerca de 2-3 logs

com relação a um ou mais níveis de proteína controle, tal como BCR e/ou ABL de tamanho total de tamanho total. Em certas modalidades, uma resposta molecular principal é atingida quando a razão de níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, níveis de BCR-ABL) para níveis de proteína controle (por exemplo, níveis de BCR ou ABL), durante a terapia com medicamento anti-câncer (por exemplo, inibidor de tirosina quinase), é reduzida em pelo menos cerca de 2-3 logs com relação à razão das mesmas proteínas antes da terapia com medicamento anti-câncer. Ao contrário das definições de resposta molecular principal que dependem da detecção de níveis transcritos de RNAm, os ensaios de detecção de proximidade dupla a base de anticorpo da presente invenção fornecem vantajosamente a capacidade de detectar uma célula cancerosa (por exemplo, CML) no meio de cerca de 100.000 células de um doador saudável, possibilitando por meio disso a determinação de uma resposta molecular principal medindo e comparando os níveis protéicos de BCR-ABL, BCR, e/ou ABL. Em outras modalidades, uma resposta molecular principal é uma classificação clínica, definida como uma redução de pelo menos 3-logs abaixo de um valor de linha de base padronizado em uma escala logarítmica (base 10), na razão de transcritos de RNAm de BCR-ABL tanto para transcritos de RNAm de ABL quanto de BCR, expressa como um percentual dos níveis dos transcritos de RNAm de ABL ou BCR. Em certos exemplos, o nível de transcritos de RNAm é determinado usando métodos de RT-PCR quantitativa em tempo real (PCRq). Em modalidades adicionais, uma resposta molecular principal é a condição quando a razão de BCR-ABL para transcritos de RNAm de ABL, BCR ou controle é determinada por PCRq para ser um valor definido como  $\leq 0,1\%$  na escala internacional (IS). A IS é ancorada na escala de redução de perfil estabelecida pelos laboratórios participantes no International Randomized Study of Interferon versus STI571 (IRIS) clinical study. Ver, por exemplo, Hughes et al., N. Engl J. Med., 349:1423-1432 (2003); Hughes et

al., Sangue, 108:28-37 (2006), Brand et al., Sangue, 112:3330-3338 (2008); e Baccarani et al., J. Clin. Oncol, 27:6041-6051 (2009).

Uma "resposta molecular completa", "remissão molecular completa" ou "CMR" é atingida quando o nível de uma proteína de fusão oncogênica, tal como BCR-ABL, diminui em pelo menos cerca de 3-4 logs com relação a um ou mais níveis de proteína controle, tais como BCR e/ou ABL de tamanho total de tamanho total. Em certas modalidades, uma resposta molecular completa é atingida quando a razão de níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, níveis de BCR-ABL) para os níveis de proteína controle (por exemplo, níveis de BCR ou ABL), durante medicamento anti-câncer terapia, é reduzida em pelo menos cerca de 3-4 logs com relação à razão das mesmas proteínas antes da terapia com medicamento anti-câncer (por exemplo, inibidor de tirosina quinase). Ao contrário das definições de resposta molecular completa, que dependem da detecção de níveis transcritos de RNAm, os ensaios de detecção de proximidade dupla a base de anticorpo da presente invenção fornecem vantajosamente a capacidade de detectar uma célula cancerosa (por exemplo, CML) no meio de cerca de 1.000.000 células de um doador saudável, possibilitando por meio disso a determinação de uma resposta molecular completa medindo e comparando os níveis proteicos de BCR-ABL, BCR, e/ou ABL. Em outras modalidades, uma resposta molecular completa é uma classificação clínica na qual os transcritos de RNAm de BCR-ABL são não detectáveis por PCRq, e/ou PCR em ninho, em pelo menos duas amostras consecutivas de sangue de qualidade adequada, de maneira a garantir a capacidade de detectar uma queda de 4,0-4,5-log nos níveis de RNAm de BCR-ABL. Em certos exemplos, uma resposta molecular completa pode ser definida como uma redução de pelo menos 4,5-logs abaixo de um valor de linha de base padronizado em uma escala logarítmica na razão de BCR-ABL para transcritos de RNAm de ABL, BCR ou controle, expressa como um percentual. Ver, por exemplo, Press et al., Blood, 107:4250-4256

(2006); Muller et al., Leukemia., 23:1957-1963 (2009); e Baccarani et al., J. Clin. Oncol., 27:6041-6051 (2009).

O termo "período da terapia" inclui qualquer abordagem terapêutica obtida para aliviar ou prevenir um ou mais sintomas associados a um câncer, tal como uma malignidade hematológica (por exemplo, leucemia, linfoma, etc.). O termo inclui administrar qualquer composto, medicamento, procedimento e/ou regime usado para melhorar a saúde de um indivíduo com câncer, e inclui qualquer dos agentes terapêuticos aqui descritos. Os versados na técnica entenderão que tanto o período da terapia quanto a dose do período da terapia atual podem ser mudados (por exemplo, aumentados ou diminuídos), com base na expressão e/ou níveis de ativação de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas e/ou moléculas de transdução de sinal, determinados usando os métodos da presente invenção.

### **III. Descrição das modalidades**

A presente invenção fornece arranjos a base de anticorpo para detectar o estado de ativação, e/ou a quantidade total de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas e/ou moléculas de transdução de sinal em uma amostra biológica, tal como um extrato ou lisado celular. A presente invenção também fornece métodos de usar tais arranjos para facilitar prognóstico e diagnóstico de câncer, a previsão ou identificação de resistência ao tratamento com medicamento, e a determinação de terapias personalizadas e alvejadas. Em modalidades particulares, as composições e métodos da presente invenção identificam vantajosamente pacientes que são resistentes à terapia com um inibidor de tirosina quinase, tal como imatinib, em virtude das mutações na proteína quinase alvo (por exemplo, BCR-ABL), não adequação ao regime terapêutico, e/ou administração de uma dose de medicamento subideal.

Em uma modalidade particular, a presente invenção fornece ensaios tais como, por exemplo, imunoensaios, para a detecção em tempo real do nível de expressão e/ou do grau de ativação (por exemplo, fosforilação) de

BCR-ABL, substratos destes e/ou outras moléculas de transdução de sinal em uma amostra biológica, tal como um extrato ou lisado celular. Como tal, a presente invenção fornece vantajosamente benefícios aos pacientes com malignidades hematológicas, tal como CML, que recebem uma ou mais terapias alvejadas, selecionando e monitorando-os durante todo o período da terapia e avaliando se eles podem ser alterados para uma terapia alvejada alternativa tal como, por exemplo, nilotinib (Tasigna<sup>®</sup>), para inibir eficientemente a molécula alvo (por exemplo, BCR-ABL) com toxicidade mínima.

Em certas modalidades, a presente invenção fornece um método com uma faixa de sensibilidade superior para a detecção de proteínas de fusão oncogênicas, tal como BCR-ABL. Os imunoenaios atuais para detectar proteínas BCR-ABL em extratos celulares podem detectar, em geral, uma célula leucêmica positiva para BCR-ABL em 10-100.000 células normais, equivalente a uma sensibilidade de detecção de 10-0,001 % (ver, por exemplo, Jilani et al., *Leuk. Res.*, 32:936-943 (2008); Weerkamp et al., *Leukemia*, 23: 1 106-1117 (2009); Raponi et al., *Haematologica*, 94: 1767-1770 (2009); e publicação de patente U.S. 2006/0172345). Os ensaios de proximidade aqui descritos exibem vantajosamente maior sensibilidade em cerca de 1:100.000-10.000.000 células (isto é, uma célula leucêmica para cerca de 100.000-10.000.000 células normais; equivalente a uma sensibilidade de detecção de cerca de 0,001-0,00001 %) ou cerca de 1:1.000.000-10.000.000 células (isto é, uma célula leucêmica para cerca de 1.000.000-10.000.000 células normais; equivalente a uma sensibilidade de detecção de cerca de 0,0001-0,00001 %) e incluem, por exemplo, cerca de 1:100.000 células, 1:200.000 células, 1:300.000 células, 1:400.000 células, 1:500.000 células, 1:600.000 células, 1:700.000 células, 1:800.000 células, 1:900.000 células, 1:1.000.000 células, 1:2.000.000 células, 1:3.000.000 células, 1:4.000.000 células, 1:5.000.000 células, 1:6.000.000 células,

1:7.000.000 células, 1:8.000.000 células, 1:9.000.000 células, 1:10.000.000 células, 1:100.000-500.000 células, 1:100.000-1.000.000 células, 1:500.000-1.000.000 células, 1:100.000-5.000.000 células, 1:500.000-10.000.000 células, 1:2.000.000-10.000.000 células, 1:5.000.000-10.000.000 células, 5 1:1.000.000-7.500.000 células, 1:1.000.000-5.000.000 células, e quaisquer outras faixas aqui. A sensibilidade dos métodos aqui descritos pode ser comparável ou exceder àquela dos ensaios padrões de BCR-ABL a base de ácido nucleico (por exemplo, PCRq ou PCR em ninho), que está na faixa de detecção de 1 célula leucêmica para 10.000-1.000.000 células normais. Para 10 descrições adicionais da faixa de sensibilidade dos ensaios de BCR-ABL a base de ácido nucleico, ver, por exemplo, Press et al., Blood, 107:4250-4256 (2006) e Radish JP, Blood, 114:3376-3381 (2009).

Em modalidades particulares, os ensaios de proximidade a base de anticorpo da presente invenção possibilitam vantajosamente um maior 15 grau de sensibilidade e/ou especificidade na detecção da presença, nível, e/ou estado de ativação de proteínas de fusão oncogênicas, tal como BCR-ABL, comparados aos imunoenaios atuais e ensaios a base de ácido nucleico para detectar BCR-ABL, fornecendo por meio disso uma determinação mais exata dos indicadores de resposta, por exemplo, tais como uma resposta 20 citogenética completa, uma resposta molecular principal, uma resposta molecular completa e combinações destas. Como um exemplo não limitante, os ensaios a base de ácido nucleico atuais não são sensíveis o suficiente para detectar quantidades muito pequenas de transcritos de BCR-ABL em uma amostra do paciente, de maneira tal que uma determinação de uma resposta 25 molecular completa, usando ensaios a base de ácido nucleico atuais, não signifique necessariamente que o paciente está curado e não apresenta mais a doença mediada por BCR-ABL (por exemplo, CML).

---

Em um aspecto, a presente invenção fornece um método para determinar o nível ou estado de ativação de uma proteína de fusão oncogênica, o método compreendendo:

5 (a) colocar um extrato celular em contato com uma primeira fração de ligação específica para um primeiro domínio de uma primeira proteína de tamanho total, em condições adequadas para transformar a primeira proteína de tamanho total presente no extrato celular em um complexo que compreende a primeira proteína de tamanho total e a primeira fração de ligação, em que o primeiro domínio da primeira proteína de  
10 tamanho total não apresenta uma proteína de fusão oncogênica correspondente, que compreende um segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total fundido a um primeiro domínio de uma segunda proteína de tamanho total diferente;

(b) remover o complexo da etapa (a), a partir do extrato  
15 celular, para formar um extrato celular desprovido da primeira proteína de tamanho total;

(c) colocar o extrato celular da etapa (b) em contato com uma segunda fração de ligação específica para o segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total, em condições adequadas para transformar  
20 a proteína de fusão oncogênica presente no extrato celular em um complexo que compreende a proteína de fusão oncogênica e a segunda fração de ligação; e

(d) determinar o nível ou estado de ativação do complexo da etapa (c), determinando por meio disso o nível ou estado de ativação da  
25 proteína de fusão oncogênica.

Em uma modalidade, o extrato celular compreende um extrato de células isoladas de uma amostra. Em certos exemplos, a amostra é selecionada a partir de sangue total, soro, plasma, aspirado por agulha fina (FNA), urina, escarro, fluido do lavado brônquico, lágrimas, aspirado de

---

mama, linfa, saliva e combinações dos mesmos. Em uma outra modalidade, a amostra é obtida a partir de um paciente com câncer. Em alguns exemplos, o câncer pode ser causado pela formação de uma proteína de fusão oncogênica em virtude de uma translocação cromossômica nas células de câncer.

- 5 Exemplos de tais cânceres incluem, mas sem limitação, uma malignidade hematológica, um sarcoma osteogênico, um sarcoma de tecido mole e combinações dos mesmos. Em modalidades particulares, a malignidade hematológica é uma leucemia ou linfoma. Em uma modalidade preferida, a leucemia é leucemia mielogênica crônica (CML). Em uma outra modalidade,
- 10 as células isoladas, a partir das quais o extrato ou lisado celular é preparado, podem compreender células tumorais circulantes, leucócitos, ou combinações dos mesmos. Em certas modalidades, as células isoladas são estimuladas *in vitro* com fatores de crescimento. Em alguns exemplos, as células isoladas são incubadas com um medicamento anti-câncer antes da estimulação com fator
- 15 de crescimento. Em outros exemplos, as células isoladas são lisadas após o estímulo com fator de crescimento para produzir o extrato celular.

Em algumas modalidades, o extrato celular é preparado a partir de amostras de medula óssea ou sangue total coletadas a fresco ou congeladas. Como um exemplo não limitante, uma amostra de sangue total

20 tratada com anti-coagulantes (por exemplo, EDTA, heparina e/ou ácido-citrato-dextrose (ACD)) é primeiro separada em uma fração de plasma ou soro e uma fração celular. A fração celular pode ser processada por lise hipotônica de células vermelhas do sangue com cloreto de amônio, e/ou centrifugação por gradiente de densidade Ficoll-HyPaque, para isolar

25 leucócitos a partir de uma amostra de sangue. As células isoladas, presentes na fração celular, podem ser lisadas para transformar por meio disso as células isoladas em um extrato celular por qualquer técnica conhecida na tecnologia, tais como aquelas descritas em Raponi et al., LeukRes, 32:923-43

---

(2008); Weerkamp et al., *Leukemia*, 23: 1106-1117 (2009) e nas patentes U.S. 6.610.498 e 6.686.165.

Em alguns exemplos, os leucócitos isolados podem ser tratados com um ou mais inibidores de protease permeáveis na célula antes da lise. Os inibidores de protease permeáveis na célula incluem, mas sem limitação, fluorofosfato de diisopropila (DFP), cloridrato de fluoreto de 4-(2-aminoetil)benzenossulfonila (AEBSF), fluoreto de fenilmetanossulfonila (PMSF) e misturas destes. Como um exemplo não limitante, os leucócitos isolados são incubados por 10-30 minutos no gelo em um tampão que contém AEBSF 20mM e PMSF 1mM em PBS. As células são centrifugadas delicadamente por 5 minutos, a 520g, a 4 °C, para separar o sobrenadante e os leucócitos isolados. O tratamento de leucócitos isolados com inibidores de protease é descrito, por exemplo, em Weerkamp et al., *Leukemia*, 23:1106-1117 (2009).

Em alguns exemplos, os leucócitos isolados podem ser incubados por até 30 minutos no gelo, em tampão de lise RIPA que contém um ou mais inibidores de protease. O tampão RIPA compreende ou consiste essencialmente em Tris HCl 50 mM, pH7,5, NaCl 150 mM, NP40 a 1 % e dodecil sulfato de sódio a 0,1 %. Em outros certos exemplos, o tampão RIPA não contém desoxicolato de sódio. Após incubação, a mistura de células é centrifugada a  $\geq 18.000g$  por 1-10 minutos, a 4 °C, para separar o extrato celular e os restos celulares. O extrato celular é coletado. Para descrições adicionais dos protocolos de lise celular, ver, por exemplo, Raponi et al., *Haematologica*, 94:1767-1770 (2009); Weerkamp et al., *Leukemia*, 23: 1106-1117 (2009); e publicação de patente U.S. US 2006/0172345.

Em algumas modalidades, o plasma é preparado a partir de amostras de sangue periférico total fresco coletado e tratado com um ou mais anti-coagulantes (por exemplo, EDTA, heparina ou ACD), tal como descrito em Jilani et al., *Leuk. Res.*, 32:936-943 (2008). Como um exemplo não

limitante, as amostras de sangue podem ser separadas em uma fração de plasma ou soro, e uma fração celular. O plasma pode ser armazenado a -70-80 °C até ser ensaiado, ou ensaiado em 96 horas de coleta de amostra de sangue.

Em certas modalidades, a proteína de fusão oncogênica é selecionada do grupo que consiste em BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RAR $\alpha$ -PML, IREL-URG, CBF $\beta$ -MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-Cal, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG, TPR-MET e combinações dos mesmos. Em modalidades particulares, a proteína de fusão oncogênica é BCR-ABL. Em certos exemplos, a primeira proteína de tamanho total é BCR, o primeiro domínio da primeira proteína de tamanho total compreende a região carboxil terminal de BCR (BCR-C), e o segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total compreende a região amino terminal de BCR (BCR-N). Em outros certos exemplos, a segunda proteína de tamanho total diferente é ABL, o primeiro domínio da segunda proteína de tamanho total diferente compreende a região carboxil terminal de ABL (ABL-C), e o segundo domínio diferente da segunda proteína de tamanho total diferente compreende a região amino terminal de ABL (ABL-N). Em uma modalidade alternativa, a primeira proteína de tamanho total é ABL e a segunda proteína de tamanho total diferente é BCR.

Em algumas modalidades, o estado de ativação é selecionado do grupo que consiste em um estado de fosforilação, estado de ubiquitinação, estado de complexação e combinações dos mesmos. Em uma modalidade preferida, a proteína de fusão oncogênica é BCR-ABL e o estado de ativação é um estado de fosforilação.

Em outras modalidades, os métodos de ensaio da presente invenção compreendem determinar adicionalmente o nível ou estado de ativação de uma ou mais moléculas de transdução de sinal. Em modalidades

particulares, a uma ou mais moléculas de transdução de sinal compreende um substrato de BCR-ABL tal como, por exemplo, CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV, BAP-1 e combinações dos mesmos.

5                   Em uma modalidade particular, a primeira fração de ligação compreende um primeiro anticorpo. Em alguns exemplos, o primeiro anticorpo é afixado a um suporte sólido. Os exemplos não limitantes de suporte sólidos incluem vidro, plástico, chipes, pinos, filtros, contas, papel, membrana, feixes de fibras e combinações dos mesmos. Em modalidades  
10 preferidas, o primeiro anticorpo é afixado a uma conta (por exemplo, conta magnética, conta de poliestireno, etc.), e a conta funciona como um rótulo de diminuição para remover a primeira proteína de tamanho total do extrato celular.

                  Em uma outra modalidade particular, a segunda fração de  
15 ligação compreende um segundo anticorpo. Em alguns exemplos, o primeiro anticorpo é afixado a um suporte sólido. Os exemplos não limitantes de suporte sólidos incluem vidro, plástico, chipes, pinos, filtros, contas, papel, membrana, feixes de fibras e combinações dos mesmos. Em uma modalidade preferida, o segundo anticorpo é mantido em um suporte sólido, tal como uma  
20 membrana (por exemplo, náilon, nitrocelulose, PVDF, etc.), em um arranjo direcionável. Em uma outra modalidade, o segundo anticorpo é afixado a uma conta (por exemplo, conta magnética, conta de poliestireno, etc.), em que a conta pode conter opcionalmente um corante tal como um fluoróforo (por exemplo, uma conta colorida). Em exemplos onde uma pluralidade de contas  
25 é usada, cada conta pode conter um corante selecionado independentemente, tal como um fluoróforo (por exemplo, um fluoróforo vermelho ou infravermelho) de diferentes intensidades ou com diferentes espectros de excitação e/ou emissão.

---

Em modalidades preferidas, as etapas (c) e (d) compreendem um ensaio de detecção de proximidade dupla (também conhecido como um imunoensaio de proximidade colaborativa ("COPIA")), da maneira aqui descrita. Em outras modalidades, as etapas (c) e (d) compreendem um ensaio

5 imunoabsorvente ligado e enzima (ELISA), um ensaio de citometria de fluxo, ou um ensaio de seleção de rótulo da maneira aqui descrita.

Em modalidades onde as etapas (c) e (d) compreendem um ensaio de detecção de proximidade dupla, a etapa (c) pode compreender adicionalmente:

10 (c') colocar o extrato celular da etapa (b) em contato com uma terceira fração de ligação e uma quarta fração de ligação em condições adequadas para transformar a proteína de fusão oncogênica, presente no extrato celular, em um complexo que compreende a proteína de fusão oncogênica e as segundas, terceiras e quartas frações de ligação,

15 em que a terceira fração de ligação é marcada com uma fração de facilitação e é específica para (por exemplo, se liga especificamente a) um ou mais epítopos presente nos seguintes domínios ou sequências: (i) o primeiro domínio da segunda proteína de tamanho total diferente; (ii) o segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total; ou (iii) o sítio de fusão entre o segundo

20 domínio diferente da primeira proteína de tamanho total e o primeiro domínio da segunda proteína de tamanho total diferente,

em que a quarta fração de ligação é marcada com um primeiro elemento de um par de amplificação de sinal, e é específica para o primeiro domínio da segunda proteína de tamanho total diferente, e

25 em que a fração de facilitação gera um agente de oxidação que canaliza e reage com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal.

Em modalidades onde as etapas (c) e (d) compreendem um ensaio de detecção de proximidade dupla, a etapa (d) pode compreender adicionalmente:

---

(d') incubar o complexo da etapa (c') com um segundo elemento do par de amplificação de sinal para gerar um sinal amplificado, e

(d'') detectar o sinal amplificado gerado a partir do primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal.

5                   Em certas modalidades, o extrato celular da etapa (b) pode ser colocado em contato com uma diluição em série, da segunda fração de ligação, para formar uma pluralidade de complexos compreendendo a proteína de fusão oncogênica e a segunda fração de ligação. Em algumas modalidades, a terceira e quarta frações de ligação pode compreender os  
10 terceiros e quartos anticorpos, respectivamente. Em alguns exemplos, o terceiro e quarto anticorpos são ambos anticorpos independentes do estado de ativação. Em tais exemplos, o sinal amplificado gerado a partir do primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal está correlacionado com a quantidade total da proteína de fusão oncogênica. Em outros exemplos, o terceiro  
15 anticorpo é um anticorpo independente do estado de ativação e o quarto anticorpo é um anticorpo dependente do estado de ativação. Em tais exemplos, o sinal amplificado gerado a partir do primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal são correlacionados com a quantidade de proteína de fusão oncogênica ativada (por exemplo, fosforilada).

20                   Em outras modalidades, a terceira fração de ligação pode ser marcada diretamente com a fração de facilitação. Ainda em outras modalidades, a quarta fração de ligação é marcada diretamente com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal. Em modalidades alternativas, a quarta fração de ligação é marcada com o primeiro elemento do  
25 par de amplificação de sinal por meio de ligação entre um primeiro elemento de um par de ligação conjugado no segundo anticorpo de detecção, e um segundo elemento do par de ligação conjugado no primeiro elemento do par de amplificação de sinal. Nestas modalidades, o primeiro elemento do par de  
~~ligação é biotina e/ou o segundo elemento do par de ligação é estreptavidina.~~

Em modalidades adicionais, a fração de facilitação é glicose oxidase. Em certos exemplos, a glicose oxidase e a terceira fração de ligação são conjugadas em uma molécula de dextrano ativada com sulfidril. Em tais exemplos, a molécula de dextrano ativada com sulfidril apresenta um peso molecular de cerca de 500kDa. Em outros exemplos, o agente de oxidação é peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Em tais exemplos, o primeiro elemento do par de amplificação de sinal é uma peroxidase tal como, por exemplo, peroxidase de rábano silvestre (HRP), e/ou o segundo elemento do par de amplificação de sinal é um reagente tiramida tal como, por exemplo, biotina-tiramida. Em modalidades particulares, o sinal amplificado é gerado por oxidação de peroxidase da biotina-tiramida para produzir uma tiramida ativada. Em certos exemplos, a tiramida ativada é detectada diretamente. Em outros certos exemplos, a tiramida ativada é detectada mediante a adição de um reagente de detecção de sinal. Os exemplos não limitantes de reagente de detecção de sinais incluem um fluoróforo marcado com estreptavidina, e uma combinação de uma peroxidase marcada com estreptavidina e um reagente cromogênico, tal como, por exemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

Em certas modalidades, os métodos de ensaio da presente invenção compreendem adicionalmente:

(e) colocar o extrato celular em contato com uma quinta fração de ligação específica para um segundo domínio da segunda proteína de tamanho total diferente, em condições adequadas para transformar a segunda proteína de tamanho total diferente presente no extrato celular em um complexo que compreende a segunda proteína de tamanho total diferente e a quinta fração de ligação, em que o segundo domínio da segunda proteína de tamanho total diferente não está presente na proteína de fusão oncogênica; e

(f) remover o complexo da etapa (e), do extrato celular, para formar um extrato celular desprovido da segunda proteína de tamanho total diferente,

---

em que etapa (e) é realizada antes, durante, ou após a etapa (a).

Em uma modalidade particular, a quinta fração de ligação compreende um quinto anticorpo. Em alguns exemplos, o quinto anticorpo é afixado a um suporte sólido. Os exemplos não limitantes de suporte sólidos incluem vidro, plástico, chipos, pinos, filtros, contas, papel, membrana, feixes de fibras e combinações dos mesmos. Em modalidades preferidas, o quinto anticorpo é afixado a uma conta (por exemplo, conta magnética, conta de poliestireno, etc.), e a conta funciona como um rótulo de diminuição para remover a segunda proteína de tamanho total diferente do extrato celular.

Figura 3A ilustra um ensaio de proximidade exemplar (300) para detectar a presença (nível total) e/ou estado de ativação (nível de fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica, tal como BCR-ABL (310). A proteína de fusão oncogênica codificada pelo gene quimérico BCR-ABL varia em tamanho, dependendo do ponto de quebra no gene BCR. O gene de fusão BCR-ABL é gerado pela translocação recíproca do gene ABL localizado no braço longo do cromossomo 9, e o gene BCR localizado no braço longo do cromossomo 22, resultando no gene de fusão oncogênica no cromossomo 22q-, também referido como o cromossomo Filadélfia. Ver, por exemplo, Kurzock et al., N. Engl. J. Med. 319:990-8 (1988); Rosenberg et al., Adv. in Virus Res. 35:39-81 (1988). Dependendo dos pontos de quebra cromossômicos que translocam o gene ABL na terminação N do gene BCR, diferentes tamanhos dos genes de fusão BCR-ABL são formados. Determina-se que os pontos de quebra no gene ABL sejam distribuídos por aproximadamente 200kb entre éxons 1b e a2, e os pontos de quebra do gene BCR sejam agrupados nas três regiões; o ponto de quebra maior (M-BCR) entre os éxons 13-15 (b2-b4); o ponto de quebra menor (m-BCR) entre os éxons alternativos 1 e 2 (e1 e e2); e o ponto de quebra micro (mu-BCR) em o íntron 19 (e19). Assim, dependendo do rearranjo do gene BCR-ABL, as

proteínas exclusivas BCL-ABL são formadas. Ver, por exemplo, Konopka et al., Cell 37: 1035-42 (1984); van Dongen, IJM, Leukemia 19:1292-5 (2005).

A proteína p210 BCR-ABL é gerada a partir dos transcritos de gene b3a2 (e14a2) e/ou b2a2 (e13a2), que são detectados em mais de 95 % dos casos de CML e um subconjunto de ALL. Esta proteína contém 1.790 aminoácidos e é composta de um domínio de oligomerização (OLI) de BCR na terminação N, seguido pelo domínio S/T quinase de BCR, um inserto de sequência de aminoácidos de BCR que não está presente em BCR normal, seguido pelos domínios SH3, SH2 e Y quinase domínios de ABL, bem como o domínio de ABL rico em prolina C-terminal. A proteína de fusão p190 BCR-ABL é codificada pelo transcrito do gene de fusão e1a2, que está associado principalmente com ALL positivo para Ph. Os raros casos de CML são em virtude de uma translocação do gene BCR-ABL do tipo p190, e nestes, a doença tende a apresentar um componente monocítico proeminente, que se assemelha a leucemia mielomonocítica crônica (CMML). A proteína p230 BCR-ABL é formada a partir do transcrito de gene e19a2 que está associado com CML neutrofílica, CML clássica e AML. Ver, por exemplo, Konopka et al., Cell 37: 1035-42 (1984); van Dongen, JJM, Leukemia 19:1292-5 (2005). Os casos excepcionais de CML foram descritos com os pontos de quebra de BCR fora das três regiões de agrupamento definido, ou com pontos de quebras não usuais em ABL (ver, por exemplo, Melo, Baillieres Clin. Haematol., 10:203-22 (1997)). O ensaio de proximidade aqui descrito é capaz de detectar tanto os níveis totais quanto ativados de uma proteína BCR-ABL codificada por um gene quimérico BCR-ABL, com um ponto de quebra em qualquer local no gene BCR.

Da maneira representada na figura 3A, a proteína de tamanho total BCR pode ser primeiro removida de uma amostra do paciente usando um rótulo de diminuição específico para a região carboxil terminal de BCR de tamanho total (331). Um exemplo não limitante de um rótulo de diminuição

como este é uma conta, na qual um anticorpo específico para a região carboxil terminal de BCR de tamanho total é afixado (321b). Uma vez que a BCR de tamanho total é removida da amostra, um anticorpo de captura específico para a região amino terminal de BCR (BCR-N) é usado para capturar a proteína de fusão BCR-ABL. Uma vez que BCR-ABL é capturada por meio de ligação entre BCR-N e o anticorpo de captura específico para BCR-N, a concentração total de BCR-ABL é determinada (340), e a BCR-ABL ativada (350) também é medida. Em algumas modalidades, a fração de facilitação (por exemplo, GO) é acoplada a um anticorpo específico para a região carboxil terminal de ABL (ABL-C), e o primeiro elemento do par de amplificação de sinal (por exemplo, HRP) é acoplado a um anticorpo específico para ABL-C em um epítipo diferente daquele reconhecido pelo anticorpo acoplado à fração de facilitação. Em certos exemplos, o anticorpo acoplado ao par de amplificação de sinal é um anticorpo independente do estado de ativação que se liga a ABL-C, independente de seu estado de ativação, e mede por meio disso a concentração total de BCR-ABL (340). Em outros certos exemplos, o anticorpo acoplado ao par de amplificação de sinal é um anticorpo dependente do estado de ativação que se liga a fosfo-ABL-C (por exemplo, pY245, pY412), e mede por meio disso a concentração de BCR-ABL ativada (350). Em uma modalidade alternativa, a fração de facilitação (por exemplo, GO) é acoplada a um anticorpo específico para BCR-N em um epítipo diferente daquele reconhecido pelo anticorpo de captura de BCR-ABL, e o primeiro elemento do par de amplificação de sinal (por exemplo, HRP) é acoplado a um anticorpo específico para ABL-C. O anticorpo acoplado ao par de amplificação de sinal pode ser um anticorpo independente do estado de ativação, ou um anticorpo dependente do estado de ativação da maneira aqui descrita.

Em algumas modalidades, a proteína ABL de tamanho total  
~~pode ser adicionalmente, ou alternativamente, removida da amostra do~~

paciente antes da captura e detecção da expressão e/ou ativação de BCR-ABL usando um rótulo de diminuição específico para a região amino terminal de ABL de tamanho total (330). Um exemplo não limitante de um rótulo de diminuição como este é uma conta na qual um anticorpo específico para a região amino terminal de ABL de tamanho total é afixado (321a). Nestas modalidades, uma vez que BCR-ABL é capturada por meio da ligação entre ABL-C e um anticorpo de captura específico para ABL-C, a concentração total de BCR-ABL é determinada (360), e a BCR-ABL ativada (370) também é medida. Em algumas modalidades, a fração de facilitação (por exemplo, GO) é acoplada a um anticorpo específico para ABL-C em um epítopo diferente daquele reconhecido pelo anticorpo de captura BCR-ABL, e o primeiro elemento do par de amplificação de sinal (por exemplo, HRP) é acoplado a um anticorpo específico para BCR-N. Em certos exemplos, o anticorpo acoplado à fração de facilitação é um anticorpo independente do estado de ativação que se liga a ABL-C,, independente de seu estado de ativação, e mede por meio disso a concentração total de BCR-ABL (360). Em outros certos exemplos, o anticorpo acoplado à fração de facilitação é um anticorpo dependente do estado de ativação que se liga a fosfo-ABL-C (por exemplo, pY245, pY412) e mede por meio disso a concentração da BCR-ABL ativada (370).

Em modalidades onde a fração de facilitação é GO e o primeiro elemento do par de amplificação de sinal é HRP, a ligação tanto do anticorpo acoplado a GO quanto do anticorpo acoplado a HRP na proteína de fusão BCR-ABL traz a fração GO em proximidade suficiente com a fração HRP, de maneira tal que um sinal gerado pela fração GO (isto é,  $H_2O_2$ ) possa canalizar na fração HRP, resultando na geração de um sinal detectável e/ou amplificável. Uma vantagem de canalizar por proximidade, da maneira usada nos métodos aqui descritos, é que um sinal detectável simples que está correlacionado com os níveis de proteína total ou ativada de BCR-ABL é gerado apenas na ligação de todos os três anticorpos (por exemplo, anticorpo

de captura, anticorpo acoplado à fração de facilitação, e anticorpo acoplado ao par de amplificação de sinal), resultando em menor especificidade do ensaio, menos fundamento e detecção simplificada.

Uma modalidade alternativa (400) para detectar a presença (nível total) e/ou estado de ativação (nível de fosforilação) de BCR-ABL (410) usando anticorpos de ligação é mostrada na figura 3B. Novamente, as contas (421a e/ou 421b) são usadas para remover as proteínas BCR e/ou ABL de tamanho total, por exemplo, por suas terminações carboxila e amino, respectivamente. A seguir, capturando a porção N-terminal de BCR-ABL que usa uma fração de ligação específica imobilizada em um suporte sólido, a concentração total de BCR-ABL é determinada (440), e a BCR-ABL ativada (450) também é medida. A BCR-ABL total (460) e a proteína ativada (470) também podem ser determinadas capturando ABL-C, tanto usando um anticorpo de ligação para medir os níveis totais de BCR-ABL, quanto usando um anticorpo específico para fosforilação de ABL para medir os níveis de BCR-ABL ativada.

Em particular, a figura 3B (440) ilustra que a quantidade total de BCR-ABL presente em uma amostra biológica, tal como soro, pode ser detectada colocando o analito capturado em contato com (i) um primeiro anticorpo de detecção (isto é, anticorpo de ligação), específico para o sítio ou ponto de fusão entre a região amino terminal de BCR (BCR-N) e a região carboxil terminal de ABL (ABL-C), e (ii) um segundo anticorpo de detecção específico para ABL-C. Tanto o primeiro quanto o segundo anticorpo de detecção se liga a BCR-ABL independente de seu estado de ativação. O primeiro anticorpo de detecção (isto é, anticorpo de ligação) é marcado com glicose oxidase (GO), e o segundo anticorpo de detecção é marcado com peroxidase de rábano silvestre (HRP). A ligação tanto do primeiro quanto do segundo anticorpo de detecção na proteína de fusão BCR-ABL traz a fração GO em proximidade suficiente com a fração HRP, de maneira tal que um

sinal gerado pela fração GO (isto é,  $H_2O_2$ ) possa canalizar a fração HRP, resultando na geração um sinal detectável e/ou amplificável.

A figura 3B (450) ilustra adicionalmente que a quantidade da BCR-ABL ativada presente em uma amostra biológica, tal como soro, pode ser detectada colocando o analito capturado em contato com (i) um primeiro anticorpo de detecção (isto é, anticorpo de ligação), específico para o sítio ou ponto de fusão entre BCR-N e ABL-C, e (ii) um segundo anticorpo de detecção específico para uma forma de BCR-ABL ativada (por exemplo, fosforilada). O primeiro anticorpo de detecção se liga a BCR-ABL, independente de seu estado de ativação, enquanto o segundo anticorpo de detecção se liga a um sítio de ativação (por exemplo, fosforilação) presente no domínio ABL-C da proteína de fusão. O primeiro anticorpo de detecção (isto é, anticorpo de ligação) é marcado com glicose oxidase (GO), e o segundo anticorpo de detecção é marcado com peroxidase de rábano silvestre (HRP). A ligação tanto do primeiro quanto do segundo anticorpo de detecção com a proteína de fusão BCR-ABL traz a fração GO em proximidade suficiente com a fração HRP, de maneira tal que um sinal gerado pela fração GO ( $H_2O_2$ ) possa canalizar na fração HRP, resultando na geração um sinal detectável e/ou amplificável.

Em modalidades onde as etapas (c) e (d) compreendem um ELISA, o ELISA pode compreender um ELISA em sanduíche. Qualquer par de anticorpo adequado pode ser usado para a captura e detecção de anticorpos em um ELISA em sanduíche. Os versados na técnica saberão e entenderão como selecionar um par de anticorpo apropriado para o ensaio. Em geral, dois anticorpos que são selecionados se ligam ao alvo de interesse, por exemplo, BCR-ABL, em diferentes epítomos, de maneira tal que a ligação do primeiro anticorpo (captura) não interfira com o segundo anticorpo (de detecção). Em modalidades preferidas, o primeiro anticorpo (captura) se liga ao segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total (por exemplo, BCR-N), e o segundo anticorpo (de detecção) se liga a o primeiro domínio da

segunda proteína de tamanho total diferente (por exemplo, ABL-C). Em certas modalidades, o anticorpo de detecção será conjugado a uma enzima, por exemplo, peroxidase de rábano silvestre (HRP) ou fosfatase alcalina (AP), para auxiliar na detecção do complexo. Em outras modalidades, um anticorpo secundário conjugado a uma enzima (por exemplo, HRP ou AP), que se liga a o anticorpo de detecção, pode ser usado no ensaio. Em geral, o complexo será então detectado pelo uso de um substrato luminescente, por exemplo, Ultra LITE™ (NAG Research Laboratories); SensoLyte® (AnaSpec); substrato de sensibilidade máxima SuperSignal ELISA Femto (Thermo Scientific); substrato quimioluminescente SuperSignal ELISA Pico (Thermo Scientific); e CPSD (fosfato de dissódio 3-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tríciclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-il)fenil; Tropix, Inc). O substrato CPSD pode ser encontrado em sistemas de detecção quimioluminescentes, tal como, por exemplo, o sistema ELISA-Light™ (Applied Biosystems). Em uma modalidade preferida, o ELISA em sanduíche de BCR-ABL compreende o uso de um anticorpo anti-BCR-N como o anticorpo de captura, em que o anticorpo de captura é mantido em um suporte sólido tal como um poço de microplaca, e um anticorpo anti-ABL-C conjugado com HRP como o anticorpo de detecção, em que o anticorpo de detecção pode compreender um anticorpo independente do estado de ativação ou um anticorpo dependente do estado de ativação (por exemplo, fosfo-específico).

A figura 3C ilustra modalidades exemplares de ELISA em sanduíche (500) para detectar a presença (nível total) e/ou estado de ativação (nível de fosforilação) de BCR-ABL (510). As contas (521a e/ou 521b) são usadas para remover a proteína de tamanho total BCR e/ou ABL, por exemplo, por suas terminações carboxil e N, respectivamente. A seguir, usando ELISA e capturando a porção da terminação N de BCR-ABL que usa uma fração de ligação específica, a concentração total de BCR-ABL é determinada (540), e a BCR-ABL ativada (550) também é medida. A BCR-

ABL total (560) e a proteína ativada (570) também podem ser determinadas capturando ABL-C, e a seguir colocando a proteína BCR-ABL de fusão capturada em contato com um anticorpo de detecção específico para BCR-N, ou um anticorpo de detecção específico para o sítio de fosforilação em ABL-C, respectivamente, usando ELISA.

Em modalidades onde as etapas (c) e (d) compreendem um ensaio de citometria de fluxo (FCM), o ensaio FCM pode compreender um ensaio de separação de células ativado por fluorescência (FACS). A citometria de fluxo é uma técnica para contar e examinar partículas microscópicas, tais como células, suspendendo-as em uma corrente de fluido e passando-as por um aparelho de detecção eletrônica. A citometria de fluxo permite a análise multiparamétrica simultânea das características físicas e/ou químicas de até milhares de partículas por segundo. Em citometria de fluxo, um feixe de luz (em geral luz laser) de um comprimento de onda único é direcionado para uma corrente focada hidrodinamicamente de fluido. Inúmeros detectores são focados no ponto onde a corrente passa por meio do feixe de luz: um em linha com o feixe de luz (espalhamento para frente ou FSC) e vários perpendiculares a este (espalhamento lateral (SSC) e um ou mais detectores fluorescentes). Cada partícula suspensa de cerca de 0,2 a cerca de 150 micrometros que passa por meio do feixe espalha o raio, e os produtos químicos fluorescentes encontrados na partícula ou afixados à partícula podem ser excitados na emissão de luz em um comprimento de onda maior do que aquele da fonte de luz. Esta combinação de luz espalhada e fluorescente é capturada pelos detectores e, analisando flutuações na luminosidade em cada detector (uma para cada pico de emissão fluorescente), é então possível direcionar vários tipos de informação com relação à estrutura física e química de cada partícula individual. O FSC está relacionado com o volume celular e SSC depende da complexidade interna da partícula. Alguns citômetros de fluxo eliminam a necessidade de fluorescência e usam apenas

espalhamento de luz para a medição, enquanto outros citômetros de fluxo formam imagens de cada fluorescência de partícula individual, luz espalhada e luz transmitida.

O FACS é um tipo especializado de citometria de fluxo.

- 5 Fornece um método para distribuir uma mistura heterogênea de partículas em dois ou mais recipientes, uma partícula por vez, com base no espalhamento de luz específica e características fluorescentes de cada partícula. É um instrumento científico usado, já que é fornecido rápido, objetivo e quantitativo que registra sinais de fluorescência de partículas individuais, bem como
- 10 separação física de partículas de interesse particular. A suspensão de partícula é mantida no centro de uma corrente de líquido limitada que flui rapidamente. O fluxo é arranjado de maneira tal que exista uma grande separação entre as partículas com relação ao seu diâmetro. Um mecanismo de vibração faz com que a corrente de partículas se rompa em gotículas
- 15 individuais. O sistema é ajustado de maneira que exista uma baixa probabilidade de mais de uma partícula por gotícula. Logo antes da corrente se romper em gotículas, o fluxo passa por uma estação de medição de fluorescência, onde o caráter fluorescente de interesse de cada partícula é medido. Um anel de carga elétrica é colocado apenas no ponto onde a
- 20 corrente se rompe em gotículas. Uma carga é colocada no anel com base na intensidade de fluorescência imediatamente antes da medição, e a carga oposta é capturada na gotícula, uma vez que foi rompida da corrente. As gotículas carregadas então não conseguem atingir um sistema de deflexão eletrostática que desvia as gotículas em recipiente com base em sua carga. Em
- 25 alguns sistemas, a carga é aplicada diretamente na corrente, e a separação em gotículas mantém a carga do mesmo sinal da corrente. A corrente então se torna neutra após a separação das gotículas. Um ensaio FACS pode ser realizado usando um citômetro de fluxo FACSCalibur, disponível pela BD Biosciences (São José, CA).
-

Em certas modalidades, um ensaio FACS é realizado usando dois anticorpos que se ligam ao alvo de interesse, por exemplo, BCR-ABL, em diferentes epítomos, de maneira tal que a ligação do primeiro anticorpo (captura) não interfira com o segundo anticorpo (de detecção). Em modalidades preferidas, o primeiro anticorpo (captura) se liga ao segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total (por exemplo, BCR-N), e o segundo anticorpo (de detecção) se liga a o primeiro domínio da segunda proteína de tamanho total diferente (por exemplo, ABL-C). Em certas modalidades, os anticorpos de captura são afixados às contas, tais como contas de poliestireno, e as contas são coradas internamente com fluoróforos. Em algumas modalidades, o anticorpo de detecção é conjugado a um fluoróforo ou uma enzima para auxiliar na detecção do complexo. O anticorpo de detecção pode compreender um anticorpo independente do estado de ativação ou um anticorpo dependente do estado de ativação (por exemplo, fosfo-específico). Em outras modalidades, um fluoróforo, enzima, ou outra fração de detecção que se liga ao anticorpo de detecção, pode ser usado no ensaio. Em geral, o complexo pode então ser detectado da maneira descrita anteriormente.

Em modalidades onde as etapas (c) e (d) compreendem um ensaio de seleção de rótulo, o ensaio de seleção de rótulo pode compreender um ensaio Luminex<sup>®</sup>. Os ensaios Luminex<sup>®</sup> são disponíveis, por exemplo, a partir da Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). Em alguns exemplos, o ensaio de seleção de rótulo compreende um formato de ensaio multiplex Luminex<sup>®</sup>. Em geral, dois anticorpos que são selecionados se ligam ao alvo de interesse, por exemplo, BCR-ABL, em diferentes epítomos, de maneira tal que a ligação do primeiro anticorpo (captura) não interfira com o segundo anticorpo (de detecção). Em modalidades preferidas, o primeiro anticorpo (captura) se liga ao segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total (por exemplo, BCR-N) e o segundo anticorpo (de detecção) se

liga ao primeiro domínio da segunda proteína de tamanho total diferente (por exemplo, ABL-C). Em certas modalidades, os anticorpos de captura são afixados às contas de poliestireno, e as contas são coradas internamente com fluoróforos vermelhos e infravermelhos de intensidades diferentes. Em algumas modalidades, o anticorpo de detecção é conjugado com um fluoróforo ou uma enzima para auxiliar na detecção do complexo. O anticorpo de detecção pode compreender um anticorpo independente do estado de ativação ou um anticorpo dependente do estado de ativação (por exemplo, fosfo-específico). Em outras modalidades, um fluoróforo, enzima, ou outra fração de detecção, que se liga a o anticorpo de detecção, pode ser usado no ensaio. Em geral, o complexo pode então ser detectado, por exemplo, pelo uso de um sistema de detecção tal como um sistema de detecção Luminex® 100™ ou 200™, em que as contas podem ser lidas em único arquivo, por laser duplo, para classificação e quantificação de cada analito.

A figura 3D ilustra modalidades exemplares de citometria de fluxo e seleção de rótulo (600) para detectar a presença (nível total) e/ou estado de ativação (nível de fosforilação) de BCR-ABL (610). As contas (621a e/ou 621b) são usadas para remover as proteínas BCR e/ou ABL de tamanho total, por exemplo, por suas terminações carboxil e N, respectivamente. A seguir, uma conta específica para capturar a porção da terminação N de BCR-ABL que usa uma fração de captura específica, e uma conta específica para a terminação C de ABL, são usadas. A proteína total (640) é determinada contando moléculas com os dois rótulos específicos ou contas coloridas. De maneira similar, a quantidade de proteína ativada pode ser determinada usando uma conta com um anticorpo de captura específico para a porção fosforilada de ABL e a terminação N de BCR-ABL. Contando estas duas contas coloridas específicas ou rótulos, a quantidade da BCR-ABL ativada é medida (650). A BCR-ABL total (660) e a proteína ativada (670) também podem ser determinadas capturando a terminação C de ABL com

uma conta de captura específica, e colocando a proteína de fusão BCR-ABL capturada em contato com uma conta específica para a BCR-N, ou uma conta específica para a porção fosforilada de ABL. Contando estas duas contas coloridas específicas ou rótulos, a quantidade de proteína BCR-ABL total (660) ou ativada (670) é medida.

Os exemplos não limitantes de anticorpos adequados para uso nos métodos para medir níveis de proteína BCR-ABL total e/ou ativada, ilustrados nas figuras 3A-3D, incluem aqueles apresentados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1. Anticorpos exemplares para os ensaios de BCR-ABL da presente invenção.

| Alvo | Ab          | Clone  | Epitope        | Fornecedor |
|------|-------------|--------|----------------|------------|
| Bcr  | AF5129      |        | N-terminal     | R&D        |
|      | sc-48422    | H-5    | N-terminal     | Santa Cruz |
|      | 1684        | EP535Y | C-terminal     | Epitomics  |
| Abl  | AF5414      |        | C-terminal     | R&D        |
|      | 4G10        |        | fosfo-tirosina | Millipore  |
|      | ab62189     |        | pY245          | Abcam      |
|      | PAB0397     |        | pY245          | Novus      |
|      | ab47315     |        | pY412          | Abcam      |
|      | ab55284     |        | pY412          | Abcam      |
|      | NB100-92665 |        | pY412          | Novus      |

Exemplos adicionais de anticorpos que se ligam tanto a proteínas de fusão BCR-ABL específicas de tumor, quanto a proteínas BCR ou ABL de tamanho total naturais não oncogênicas incluem, mas sem limitação, o anticorpo monoclonal 7C6 específico do epítipo BCR b2 que reconhece proteínas b2a2 p210 BCR-ABL, b3a2 p210 BCR-ABL, p160 BCR e p130 BCR descritas em Dhut et al., *Oncogene*, 3:561-6 (1988), o anticorpo 8E9 específico do domínio SH2 que reconhece proteínas ela2 p190 BCR-ABL, b2a2, b3a2, e p145 ABL descritas nas patentes U.S. 5.369.008 e 6.610,498, o anticorpo específico da terminação amino de BCR descrito na patente U.S. 6.107.457, e o anticorpo monoclonal #SC-23 de camundongo específico da terminação carboxil de ABL (24-1 1) da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA).

Os exemplos de anticorpos de ligação adequados para a ligação no sítio ou ponto de fusão da proteína quimérica BCR-ABL incluem, mas sem limitação, o anticorpo monoclonal de camundongo #3908 específico para a ligação de BCR-ABL b2a2 (L99H4), disponível pela Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA), os anticorpos isolados específicos da proteína de fusão p210 BCR-ABL descritos na publicação de patente U.S. 20050214301, o anticorpo policlonal BP-2 específico da ligação de BCR-ABL b3a2 descrito em van Denderen et al., *Leukemia*, 6:1107-12 (1992), e o anticorpo monoclonal específico de ligação BCR-ABL e1a2 (ER-FP1) descrito em van Denderen et al., *Leukemia*, 8:1503-9 (1994). Os anticorpos de ligação BCR-ABL podem ser usados para a detecção de proteínas de fusão BCR-ABL que estão associadas, mas sem limitação, com leucemias positivas para Ph.

Em certas modalidades, os métodos da presente invenção fornecem o preparo do extrato celular a partir de amostras de medula óssea (por exemplo, aspirado de medula óssea), ou sangue total, coletadas recentemente ou congeladas, recuperando ou isolando células de interesse tais como células brancas do sangue (por exemplo, células de leucemia mielogênica crônica (CML)), por exemplo, usando conta magnética de captura com anticorpos anti-CD45 e/ou anticorpos anti-CD15, sem nenhuma etapa de lavagem após a recuperação ou isolamento celular. O extrato celular assim obtido pode ser analisado com relação ao nível de expressão e/ou ativação de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, tal como BCR-ABL, substratos destas, vias destas ou combinações destas. Sem ficar preso a nenhuma teoria em particular, a eliminação da necessidade de qualquer das etapas de lavagem após o isolamento celular é vantajosa, em decorrência das células de interesse que podem ser recuperadas a partir de amostras de sangue ou medula óssea sem alterar a concentração intracelular de um medicamento anti-câncer, tal como um inibidor de tirosina quinase. Da maneira apresentada no exemplo 9 a seguir, o isolamento celular sem nenhuma das etapas de

lavagem, da maneira aqui descrita, é contrário à prática aceita na técnica de lavar as células após o isolamento (por exemplo, células ligadas à conta de lavagem) e fornece extratos celulares de células recuperadas sem diluição substancial de um medicamento anti-câncer, tal como um inibidor de tirosina quinase (por exemplo, Gleevec<sup>®</sup>, Tasigna<sup>®</sup>, Sprycel<sup>®</sup>, etc.) dentro das células.

Em modalidades alternativas, os métodos da presente invenção fornecem a detecção simultânea da quantidade total, e/ou estado de ativação de uma proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL), em combinação com uma ou ambas as proteínas de tamanho total naturais que contém sequências ou domínios encontrados na proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR e/ou ABL de tamanho total). Em uma modalidade particular, o presente método possibilita a detecção e/ou medição de ambos os níveis totais de BCR-ABL, bem como os níveis totais de BCR e/ou ABL de tamanho total natural em uma amostra biológica, tal como uma amostra de sangue ou aspirado de medula óssea. Em certas modalidades, os níveis de proteína natural (por exemplo, BCR e/ou ABL de tamanho total) são determinados junto com os níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL) de uma maneira multiplexada em uma mesma peça. Nestas modalidades, a proteína de tamanho total natural pode ser isolada vantajosamente junto com a proteína de fusão oncogênica, de maneira tal que os níveis destas moléculas sejam determinados na mesma peça.

Da maneira apresentada no exemplo 10 a seguir, estas modalidades alternativas para os métodos da presente invenção podem ser usadas para detectar e/ou medir os níveis totais de BCR-ABL, bem como os níveis totais de BCR ou ABL de tamanho total natural, e uma razão de níveis totais de BCR-ABL para os níveis de BCR ou ABL de tamanho total natural podem ser calculados. Em alguns exemplos, a razão de níveis de BCR-ABL para os níveis de BCR ou ABL de tamanho total natural é calculada para fornecer uma determinação mais exata de indicadores de resposta tais como,

por exemplo, uma resposta molecular principal (MMR), uma resposta molecular completa (CMR), uma resposta citogenética completa (CCyR), e combinações destas. Em outros exemplos, estas modalidades alternativas para os métodos da presente invenção podem ser usadas para monitorar as mudanças na expressão de BCR-ABL, com relação a um controle, tal como BCR ou ABL de tamanho total natural (por exemplo, calculando uma razão dos níveis de BCR-ABL total para os níveis de BCR ou ABL de tamanho total natural) como uma função de terapia (por exemplo, terapia com inibidor de tirosina quinase).

Os métodos da presente invenção são usados particularmente para determinar o estado de ativação (por exemplo, fosforilação) de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, tal como BCR-ABL, em pacientes em risco de desenvolver, suspeitos de apresentar, ou diagnosticados com um câncer, tal como uma malignidade hematológica (por exemplo, leucemia, linfoma, etc.). Em certos exemplos, os métodos da presente invenção auxiliam, assistem ou facilitam no diagnóstico de um câncer em um sujeito, medindo os níveis de proteína de fusão oncogênica ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, níveis de BCR-ABL fosfo) para determinar se o sujeito expressa uma forma ativada da proteína de fusão oncogênica (por exemplo, um paciente positivo para BCR-ABL). Em outras modalidades, os métodos da presente invenção são realizados em um sujeito já determinado para expressar uma forma ativada da proteína de fusão oncogênica para otimizar a terapia, reduzir a toxicidade, e/ou monitorar a eficiência do tratamento terapêutico. Em um aspecto particular destas modalidades, o nível de proteína BCR-ABL ativada pode ser determinado em um paciente positivo para BCR-ABL, durante o período da terapia (por exemplo, enquanto o paciente está em terapia com medicamento anti-câncer, tal como Gleevec<sup>®</sup>, Tassigna<sup>®</sup>, Sprycel<sup>®</sup>, etc.), para otimizar a terapia, reduzir a toxicidade, e/ou monitorar a eficiência do tratamento terapêutico. Em algumas modalidades,

tanto os níveis de proteína de fusão oncogênica total quanto ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, BCR-ABL) são medidos de acordo com os ensaios a base de anticorpo da presente invenção, e uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) pode ser calculada e usada para avaliar o período da terapia para um sujeito, por exemplo, comparando a razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica fosfo/total com uma mesma razão calculada para o sujeito em um período inicial (por exemplo, em um período inicial, embora em terapia com medicamento anti-câncer ou em um ponto de tempo antes da terapia com o medicamento anti-câncer). Em certas modalidades, a razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, a razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) pode ser calculada com relação aos níveis de uma ou mais proteínas controle tais como, por exemplo, uma ou ambas as proteínas de tamanho total naturais que contém sequências ou domínios encontrados na proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR e/ou ABL para proteína de fusão BCR-ABL). Em modalidades preferidas, o nível total da proteína controle não é afetado ou substancialmente mudado pela terapia com medicamento anti-câncer.

Os métodos da presente invenção são também particularmente usados para determinar o estado ativação (por exemplo, fosforilação) de uma ou mais moléculas de transdução de sinal, em uma ou múltiplas vias associadas com uma proteína de fusão oncogênica, tal como BCR-ABL, em pacientes em risco de desenvolver, suspeitos de apresentar, ou diagnosticados com um câncer tal como uma malignidade hematológica (por exemplo, leucemia, linfoma, etc.). As moléculas de transdução de sinal exemplares incluem substratos de BCR-ABL tais como, por exemplo, CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV, BAP-1 e combinações dos mesmos. Em certos exemplos, os métodos da presente invenção auxiliam, assistem ou facilitam no diagnóstico de um câncer em um

sujeito medindo os níveis de proteína de fusão oncogênica ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, níveis de BCR-ABL fosfo), e níveis de molécula de transdução de sinal ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, níveis de CRKL fosfo, fosfo-JAK2, fosfo-STAT5, etc.), para determinar se o sujeito expressa uma forma ativada da proteína de fusão oncogênica (por exemplo, um paciente positivo para BCR-ABL) e/ou uma forma ativada de uma ou mais moléculas de transdução de sinal na via. Em outras modalidades, os métodos da presente invenção são realizados em um sujeito já determinado para expressar uma forma ativada da proteína de fusão oncogênica para otimizar a terapia, reduzir a toxicidade, e/ou monitorar a eficiência do tratamento terapêutico. Em um aspecto particular destas modalidades, os níveis de proteína BCR-ABL ativada e um ou mais componentes da via de transdução de sinal (por exemplo, CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, etc.) podem ser determinados em um paciente positivo para BCR-ABL, durante o período da terapia (por exemplo, enquanto o paciente está em terapia com medicamento anti-câncer, tal como Gleevec<sup>®</sup>, Tasigna<sup>®</sup>, Sprycel<sup>®</sup>, etc.), para otimizar a terapia, reduzir a toxicidade, e/ou monitorar a eficiência do tratamento terapêutico. Em algumas modalidades, tanto os níveis de proteína de fusão oncogênica total quanto ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, BCR-ABL) são medidos de acordo com os ensaios a base de anticorpo da presente invenção, e uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão de níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) pode ser calculada (por exemplo, com relação aos níveis de uma ou mais proteínas controle) e usada para avaliar o período da terapia para um sujeito, por exemplo, comparando a razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica fosfo/total com uma mesma razão, calculada para o sujeito em um estágio inicial (por exemplo, em um estágio inicial embora em terapia com medicamento anti-câncer ou em um ponto em tempo antes da terapia com medicamento anti-câncer). Em outras

modalidades, tanto os níveis de componente da via de transdução de sinal total quanto ativado são medidos e uma razão de níveis de componente da via de transdução de sinal total para ativado (por exemplo, razão de níveis de proteína CRKL, JAK2, ou STAT5 fosfo/total) pode ser calculada (por exemplo, com relação aos níveis de uma ou mais proteínas controle) e usada para avaliar o período da terapia de um sujeito, por exemplo, comparando a razão dos níveis do componente da via de transdução de sinal fosfo/total com uma mesma razão calculada para o sujeito em um estágio inicial (por exemplo, em um estágio inicial embora em terapia com medicamento anti-câncer terapia, ou em um período de tempo antes da terapia com medicamento anti-câncer). Em certos exemplos, o nível de expressão de uma proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL) pode ser correlacionado ou relacionado com o nível de ativação (por exemplo, fosforilação) dos componentes de transdução de sinal à jusante, tal como CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, etc.

Em um aspecto particular, a presente invenção fornece um método para otimizar a terapia, e/ou reduzir a toxicidade em um sujeito com câncer, e que recebe um período de terapia para o tratamento de câncer, o método compreendendo:

- (a) isolar células de câncer após a administração de um medicamento anti-câncer (por exemplo, um ou mais inibidores de tirosina quinase tal como Gleevec<sup>®</sup>, Tasigna<sup>®</sup>, Sprycel<sup>®</sup>, etc.);
  - (b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;
  - (c) medir um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio aqui descrito; e
  - (d) comparar o nível medido de expressão e/ou ativação da proteína de fusão oncogênica com um nível de expressão e/ou ativação da
-

proteína de fusão oncogênica, medido em um momento anterior, durante o período da terapia; e

(e) determinar uma dose subsequente do período da terapia para o sujeito, ou se um período da terapia diferente pode ser administrado ao sujeito com base na comparação da etapa (d).

Em modalidades particulares, tanto o nível de expressão quanto o nível de ativação da proteína de fusão oncogênica são medidos no extrato celular, por exemplo, realizando um dos ensaios de proximidade aqui descritos. Em certas modalidades preferidas, a proteína de fusão oncogênica compreende BCR-ABL. Em outras certas modalidades preferidas, o sujeito expressa uma forma ativada da proteína de fusão oncogênica. Em uma modalidade particularmente preferida, o sujeito é positivo para BCR-ABL (por exemplo, o sujeito foi determinado como apresentando níveis detectáveis de fosfo-BCR-ABL antes da administração do medicamento anti-câncer).

Em algumas modalidades, tanto os níveis de proteína de fusão oncogênica total quanto ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, BCR-ABL) são medidos no extrato celular de acordo com os ensaios a base de anticorpo da presente invenção, e uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) pode ser calculada e usada para avaliar o período da terapia para um sujeito, por exemplo, comparando a razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica fosfo/total com uma mesma razão calculada para o sujeito em um estágio inicial (por exemplo, em um estágio inicial, embora em terapia com medicamento anti-câncer, ou em um período de tempo antes da terapia com medicamento anti-câncer). Da maneira ilustrada no exemplo 6 a seguir, os níveis da razão de proteína de fusão oncogênica fosfo/total (por exemplo, BCR-ABL) na inibição do medicamento anti-câncer estão correlacionados com a inibição percentual do sinal de proteína de fusão oncogênica ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, fosfo-BCR-

ABL) em tratamento com medicamento anti-câncer (ver, por exemplo, figuras 14C, 15C, e 16C). Em outras modalidades, a razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) pode ser calculada com relação aos níveis de uma ou mais proteínas controle tais como, por exemplo, uma ou ambas as proteínas de tamanho total naturais que contém sequências ou domínios encontrados na proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR e/ou ABL for BCR-ABL). Em modalidades preferidas, o nível total da proteína controle não é afetado ou substancialmente mudado pela terapia com medicamento anti-câncer.

Em certos aspectos dos métodos aqui descritos para otimizar a terapia, menos de cerca de 50 % de inibição de ativação (por exemplo, fosforilação) dos níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL) em um sujeito, indica uma necessidade de aumentar a dose subsequente do período da terapia, ou administrar um período da terapia diferente (por exemplo, mudar o período da terapia atual alterando para um medicamento anti-câncer diferente) a fim de prevenir ou reduzir o risco de reicidência de câncer no sujeito. Como um exemplo não limitante, em exemplos onde o sujeito está em terapia com Gleevec<sup>®</sup>, menos de cerca de 50 % de inibição do nível de fosforilação de proteína BCR-ABL de fusão indica uma necessidade de aumentar a dose subsequente de Gleevec<sup>®</sup>, ou altera a terapia do sujeito para Tasigna<sup>®</sup>. Em certos exemplos, menos de cerca de 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, ou 5 % de inibição de ativação (por exemplo, fosforilação) dos níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL) em um sujeito, indica uma necessidade de aumentar a dose subsequente do período da terapia, ou mudar o período da terapia atual. Em algumas modalidades, o percentual de inibição de ativação dos níveis de proteína de fusão oncogênica pode ser determinado calculando uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total), opcionalmente com relação aos níveis de uma ou

mais proteínas controle (por exemplo, BCR e/ou ABL de tamanho total para BCR-ABL), e comparando a razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica fosfo/total com uma mesma razão calculada para o sujeito em um estágio inicial (por exemplo, em um estágio inicial, embora em terapia com medicamento anti-câncer, ou em um período de tempo antes da terapia com medicamento anti-câncer). Os versados na técnica conhecerão doses adequadas mais baixas e mais altas, nas quais o período da terapia atual pode ser ajustado de maneira tal que a terapia com o medicamento seja otimizada, por exemplo, uma dose subsequente que é pelo menos cerca de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou 100 vezes maior que a dose atual.

Em outros certos aspectos dos métodos para otimizar a terapia, menos de cerca de 50 % de inibição de ativação (por exemplo, fosforilação) dos níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL) em um sujeito, indica uma falta de cumprimento do sujeito ao período da terapia (por exemplo, o sujeito não está tomando o medicamento anti-câncer regularmente ou da maneira orientada por um médico), e/ou a existência de possíveis efeitos colaterais ou toxicidade associada com o período da terapia. Nestas modalidades, recomenda-se que o período da terapia atual seja monitorado cuidadosamente (por exemplo, por um médico ou outro profissional de assistência médica) para cumprimento, ou que um período da terapia diferente seja administrado (por exemplo, o período da terapia atual ser mudado alterando para um medicamento anti-câncer diferente) a fim de aumentar o cumprimento e/ou prevenir ou reduzir o risco de efeitos colaterais. Em certos exemplos, menos de cerca de 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, ou 5 % de inibição de ativação de níveis de proteína de fusão oncogênica em um sujeito, indica uma falta de cumprimento do sujeito ao período da terapia, e/ou a existência de possíveis efeitos colaterais ou toxicidade associada com o período da terapia.

~~Em algumas modalidades, o percentual de inibição de ativação dos níveis de~~

proteína de fusão oncogênica pode ser determinado calculando uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total), opcionalmente com relação aos níveis de uma ou mais proteínas controle (por exemplo, BCR e/ou ABL de tamanho total para BCR-ABL), e comparando a razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica fosfo/total com uma mesma razão calculada para o sujeito em um estágio inicial (por exemplo, em um estágio inicial, embora em terapia com medicamento anti-câncer, ou em um período de tempo antes da terapia com medicamento anti-câncer).

Em aspectos adicionais dos métodos aqui descritos para otimizar a terapia, mais de cerca de 80 % de inibição de ativação (por exemplo, fosforilação) dos níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL) em um sujeito, indica que o sujeito está na terapia correta e com a dose correta. Em certos exemplos, mais de cerca de 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, ou 100 % de inibição de ativação (por exemplo, fosforilação) dos níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL) em um sujeito, indica que o sujeito está na terapia como o medicamento anti-câncer correto e na dose correta. Em algumas modalidades, o percentual de inibição de ativação dos níveis de proteína de fusão oncogênica pode ser determinado calculando uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total), opcionalmente com relação aos níveis de uma ou mais proteínas controle (por exemplo, BCR e/ou ABL de tamanho total para BCR-ABL), e então comparando a razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica fosfo/total com uma mesma razão calculada para o sujeito em um estágio inicial (por exemplo, em um estágio inicial, embora em terapia com medicamento anti-câncer, ou em um período de tempo antes da terapia com medicamento anti-câncer).

---

Em um aspecto relacionado, a presente invenção fornece um método para otimizar a terapia, e/ou reduzir a toxicidade em um sujeito com câncer, e que recebe um período de terapia para o tratamento de câncer, o método compreendendo:

- 5 (a) isolar células de câncer após a administração de um medicamento anti-câncer (por exemplo, um ou mais inibidores de tirosina quinase tal como Gleevec<sup>®</sup>, Tassigna<sup>®</sup>, Sprycel<sup>®</sup>, etc.);
- (b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;
- (c) medir um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica, e uma ou mais moléculas de transdução de sinal em sua via, no extrato celular usando um ensaio aqui descrito; e
- 10 (d) comparar o nível medido de expressão e/ou ativação da proteína de fusão oncogênica, e moléculas de transdução de sinal, com um nível de expressão e/ou ativação da proteína de fusão oncogênica, e moléculas de transdução de sinal, medido em um momento inicial durante o período da terapia; e
- 15 (e) determinar uma dose subsequente do período da terapia para o sujeito, ou se um período da terapia diferente pode ser administrado ao
- 20 sujeito com base na comparação da etapa (d).

Em modalidades particulares, tanto o nível de expressão quanto o nível de ativação da proteína de fusão oncogênica e uma ou mais moléculas de transdução de sinal são medidos no extrato celular, por exemplo, realizando um dos ensaios de proximidade aqui descritos. Em certas

25 modalidades preferidas, a proteína de fusão oncogênica compreende BCR-ABL. Em outras certas modalidades preferidas, as moléculas de transdução de sinal incluem substratos BCR-ABL tais como, por exemplo, CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV, BAP-1 e combinações dos mesmos. Em modalidades adicionais, o sujeito expressa

---

uma forma ativada da proteína de fusão oncogênica. Em uma modalidade particularmente preferida, o sujeito é positivo para BCR-ABL (por exemplo, o sujeito foi determinado como apresentando níveis detectáveis de fosfo-BCR-ABL antes da administração do medicamento anti-câncer).

5                   Em algumas modalidades, tanto os níveis de proteína de fusão oncogênica total e ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, BCR-ABL), quanto os níveis de componente da via de transdução sinal (por exemplo, CRKL, JAK2, STAT5), são medidos no extrato celular de acordo com os ensaios a base de anticorpo da presente invenção, e uma razão dos  
10   níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total), e uma razão de níveis de componente da via de transdução de sinal total para ativado (por exemplo, razão dos níveis de proteína CRKL, JAK2, ou STAT5 fosfo/total), podem ser calculadas e usadas para avaliar o período da terapia para um sujeito, por  
15   exemplo, comparando a razão de proteína de fusão oncogênica fosfo/total e os níveis do componente da via de transdução de sinal com uma mesma razão, calculada para o sujeito em um estágio inicial (por exemplo, em um estágio inicial, embora em terapia com medicamento anti-câncer, ou em um período de tempo antes da terapia com medicamento anti-câncer). Em outras  
20   modalidades, a razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) e a razão dos níveis de molécula de transdução de sinal ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína CRKL, JAK2, ou STAT5 fosfo/total) podem ser calculadas com relação aos níveis de uma ou mais proteínas  
25   controle tais como, por exemplo, uma ou ambas as proteínas de tamanho total naturais que contém sequências ou domínios encontrados na proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR e/ou ABL para BCR-ABL). Em modalidades preferidas, o nível total da proteína controle não é afetado ou  
substancialmente mudado pela terapia com medicamento anti-câncer.

---

Em certos aspectos dos métodos aqui descritos para otimizar a terapia, menos de cerca de 50 % de inibição de ativação (por exemplo, fosforilação) de um, dois, três, quatro, cinco, seis, ou mais níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL), e/ou níveis de componente da via de transdução de sinal (por exemplo, CRKL, JAK2, STAT5), em um sujeito, indica uma necessidade de aumentar a dose subsequente do período da terapia ou de administrar um período da terapia diferente (por exemplo, mudança no período da terapia atual alterando para um medicamento anti-câncer diferente), a fim de prevenir ou reduzir o risco da recidiva do câncer no sujeito. Como um exemplo não limitante, em exemplos onde o sujeito está na terapia com Gleevec<sup>®</sup>, menos de cerca de 50 % de inibição do nível de fosforilação de proteína BCR-ABL de fusão, e/ou um componente da via de transdução de sinal, tal como CRKL, JAK2, e/ou STAT5, indica uma necessidade de aumentar a dose subsequente de Gleevec<sup>®</sup> ou de alterar a terapia do sujeito para Tasigna<sup>®</sup>. Em certos exemplos, menos de cerca de 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %), 15 %, 10 %, ou 5 % de inibição de ativação (por exemplo, fosforilação) de um, dois, três, quatro, cinco, seis, ou mais níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL), e/ou níveis de componente da via de transdução de sinal (por exemplo, CRKL, JAK2, STAT5), em um sujeito, indica uma necessidade de aumentar a dose subsequente do período da terapia, ou mudar o período da terapia atual. Em alguns exemplos, o percentual de inibição dos níveis de ativação de proteína de fusão oncogênica e/ou molécula de transdução de sinal pode ser determinado calculando uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total), e/ou uma razão de níveis de componente da via de transdução de sinal total para ativado (por exemplo, razão de níveis de proteína CRKL, JAK2, ou STAT5 fosfo/total), ~~opcionalmente com relação aos níveis de uma ou mais proteínas controle (por~~

exemplo, BCR de tamanho total e ou ABL para BCR-ABL), e comparando a razão fosfo/total calculada com uma mesma razão calculada para o sujeito em um estágio inicial (por exemplo, em um estágio inicial, embora em terapia com medicamento anti-câncer, ou em um período de tempo antes da terapia com medicamento anti-câncer). Os versados na técnica conhecerão doses maiores e menores doses, nas quais o período da terapia atual pode ser ajustado, de maneira tal que a terapia com o medicamento seja otimizada, por exemplo, uma dose subsequente que é pelo menos cerca de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou 100 vezes maior ou menor que a dose atual.

Em outros certos aspectos dos métodos para otimizar a terapia, menos de cerca de 50 % de inibição de ativação (por exemplo, fosforilação) de um, dois, três, quatro, cinco, seis, ou mais níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL), e/ou níveis de componente da via de transdução de sinal (por exemplo, CRKL, JAK2, STAT5), em um sujeito, indica uma falta de cumprimento do sujeito ao período da terapia (por exemplo, o sujeito não está tomando o medicamento anti-câncer regularmente, ou da maneira orientada pelo médico), e/ou a existência de possíveis efeitos colaterais ou toxicidade associados com o período da terapia.

Nestas modalidades, recomenda-se que o período da terapia atual seja monitorado cuidadosamente (por exemplo, por um médico ou outro profissional de assistência médica) para cumprimento, ou que um período da terapia diferente seja administrado (por exemplo, o período da terapia atual seja mudando alterando para um medicamento anti-câncer diferente), a fim de aumentar o cumprimento e/ou prevenir ou reduzir o risco de efeitos colaterais.

Em certos exemplos, menos de cerca de 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, ou 5 % de inibição de ativação de um, dois, três, quatro, cinco, seis, ou mais níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL), e/ou níveis de

componente da via de transdução de sinal (por exemplo, CRKL, JAK2, STAT5), em um sujeito, indica uma falta de cumprimento do sujeito ao período da terapia e/ou a existência de possíveis efeitos colaterais ou toxicidade associados com o período da terapia. Em algumas modalidades, o percentual de inibição de ativação dos níveis de proteína de fusão oncogênica e/ou molécula de transdução de sinal pode ser determinado calculando uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total), e/ou uma razão de níveis de componente da via de transdução de sinal total para ativado (por exemplo, razão dos níveis de proteína CRKL, JAK2, ou STAT5 fosfo/total), opcionalmente com relação aos níveis de uma ou mais proteínas controle (por exemplo, BCR e/ou ABL de tamanho total para BCR-ABL), e comparando a razão de fosfo/total calculada com uma mesma razão calculada para o sujeito em um estágio inicial (por exemplo, em um estágio inicial, embora em terapia com medicamento anti-câncer, ou em um período de tempo antes da terapia com medicamento anti-câncer).

Em aspectos adicionais dos métodos aqui descritos para otimizar a terapia, mais de cerca de 80 % de inibição de ativação (por exemplo, fosforilação) de um, dois, três, quatro, cinco, seis, ou mais níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL), e/ou níveis de componente da via de transdução de sinal (por exemplo, CRKL, JAK2, STAT5), em um sujeito, indica que o sujeito está na terapia correta e dose correta. Em certos exemplos, mais de cerca de 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, ou 100 % de inibição de ativação (por exemplo, fosforilação) de um, dois, três, quatro, cinco, seis, ou mais níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, BCR-ABL), e/ou níveis de componente da via de transdução de sinal (por exemplo, CRKL, JAK2, STAT5), em um sujeito, indica que o sujeito está na terapia com medicamento anti-câncer correto e na

---

dose correta. Em algumas modalidades, o percentual de inibição dos níveis de ativação de proteína de fusão oncogênica e/ou molécula de transdução de sinal pode ser determinado calculando uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) e/ou uma razão de níveis de componente da via de transdução de sinal total para ativado (por exemplo, razão dos níveis de proteína CRKL, JAK2, ou STAT5 fosfo/total), opcionalmente com relação aos níveis de uma ou mais proteínas controle (por exemplo, BCR e/ou ABL de tamanho total para BCR-ABL), e então comparando a razão fosfo/total calculada com uma mesma razão calculada para o sujeito em um estágio inicial (por exemplo, em um estágio inicial, embora em terapia com medicamento anti-câncer, ou em um período de tempo antes da terapia com medicamento anti-câncer).

Em outros aspectos dos métodos aqui descritos para otimizar a terapia, a ativação de uma via alternativa de transdução de sinal indica uma necessidade de mudar ou ajustar o período da terapia atual (por exemplo, trocar para um medicamento anti-câncer diferente). Como um exemplo não limitante, em exemplos onde o sujeito está em terapia com Gleevec®, a ativação (por exemplo, fosforilação) de uma via alternativa de transdução de sinal, tal como Src, indica uma necessidade de trocar a terapia do sujeito para Sprycel® ou Tasigna®.

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para selecionar um medicamento anti-câncer adequado para o tratamento de um câncer, o método compreendendo:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

---

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio aqui descrito; e

5 (d) determinar se o medicamento anti-câncer é adequado ou inadequado para o tratamento do câncer, comparando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência gerado na ausência do medicamento anti-câncer.

10 Em uma modalidade preferida, o método para selecionar um medicamento anti-câncer adequado para o tratamento de um câncer compreende:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

15 (b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio compreendendo uma diluição em série de anticorpos de captura específicos para a proteína de fusão oncogênica, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido;

20 (d) comparar o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência gerado na ausência do medicamento anti-câncer; e

(e) indicar se o medicamento anti-câncer é adequado para o tratamento do câncer quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica for alterado (por exemplo, substancialmente menor), comparado com o perfil de expressão e/ou ativação de referência.

25

Em algumas modalidades, os métodos da presente invenção podem ser usados para auxiliar ou assistir na seleção de um medicamento anti-câncer adequado para o tratamento de um câncer tal como, por exemplo, uma malignidade hematológica. Em outras modalidades, os métodos da presente invenção podem ser usados para melhorar a seleção de um medicamento anti-câncer adequado para o tratamento de um câncer tal como, por exemplo, uma malignidade hematológica. Em certas modalidades, o método compreende adicionalmente ou alternativamente a etapa de indicar se o medicamento anti-câncer é inadequado para o tratamento do câncer quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica não for alterado (por exemplo, não for substancialmente alterado), comparado com o perfil de expressão e/ou ativação de referência. Em modalidades adicionais, uma ou mais moléculas de transdução de sinal presentes no extrato celular são detectadas, além de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, e o medicamento anti-câncer é determinado para ser adequado ou inadequado com base neste "perfil molecular".

Ainda em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para identificar a resposta de um câncer ao tratamento com um medicamento anti-câncer, o método compreendendo:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio aqui descrito; e

(d) identificar o câncer como responsivo ou não responsivo ao tratamento com o medicamento anti-câncer, comparando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de

---

expressão e/ou ativação de referência gerado na ausência do medicamento anti-câncer.

Em uma modalidade preferida, o método para identificar a resposta de um câncer ao tratamento com um medicamento anti-câncer compreende:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio compreendendo uma diluição em série de anticorpos de captura específicos para a proteína de fusão oncogênica, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido;

(d) comparar o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência gerado na ausência do medicamento anti-câncer; e

(e) indicar se o câncer é responsivo ao tratamento com o medicamento anti-câncer quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica for alterado (por exemplo, substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão e/ou ativação de referência.

Em algumas modalidades, os métodos da presente invenção podem ser usados para auxiliar ou assistir na identificação da resposta de um câncer tal como, por exemplo, uma malignidade hematológica, para o tratamento com um medicamento anti-câncer. Em outras modalidades, os métodos da presente invenção podem ser usados para melhorar a identificação da resposta de um câncer tal como, por exemplo, uma malignidade hematológica, para o tratamento com um medicamento anti-câncer. Em certas

modalidades, o método compreende adicionalmente ou alternativamente a etapa de indicar se o câncer é não responsivo ao tratamento com o medicamento anti-câncer, quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica não é alterado (por exemplo, não é substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão e/ou ativação de referência. Em modalidades adicionais, uma ou mais moléculas de transdução de sinal presentes no extrato celular são detectadas, além de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, e o câncer é identificado como responsivo ou não responsivo ao tratamento com base neste "perfil molecular."

Ainda em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para prever a resposta de um sujeito com câncer ao tratamento com um medicamento anti-câncer, o método compreendendo:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio aqui descrito; e

(d) prever a probabilidade com a qual o sujeito responderá ao tratamento com o medicamento anti-câncer, comparando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência gerado na ausência do medicamento anti-câncer.

Em uma modalidade preferida, o método para prever a resposta de um sujeito com câncer ao tratamento com um medicamento anti-câncer compreende:

---

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

5 (c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio compreendendo uma diluição em série de anticorpos de captura específicos para a proteína de fusão oncogênica, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido;

10 (d) comparar o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência gerado na ausência do medicamento anti-câncer; e

(e) indicar se o sujeito provavelmente responderá ao tratamento com o medicamento anti-câncer quando o nível de expressão e/ou  
15 ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica for alterado (por exemplo, substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão e/ou ativação de referência.

Em algumas modalidades, os métodos da presente invenção podem ser usados para auxiliar ou assistir na previsão da probabilidade de um  
20 sujeito responder ao tratamento com um medicamento anti-câncer para um câncer tal como, por exemplo, uma malignidade hematológica. Em outras modalidades, os métodos da presente invenção podem ser usados para melhorar a previsão da probabilidade de um sujeito responder ao tratamento com um medicamento anti-câncer para um câncer tal como, por exemplo,  
25 uma malignidade hematológica. Em certas modalidades, o método compreende adicionalmente ou alternativamente a etapa de indicar se o sujeito provavelmente não responderá ao tratamento com o medicamento anti-câncer, quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica não foram mudados (por exemplo, não for

---

substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão e/ou ativação de referência. Em modalidades adicionais, uma ou mais moléculas de transdução de sinal presentes no extrato celular são detectadas, além de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, e a probabilidade de que o sujeito responderá ao tratamento é prevista com base neste "perfil molecular".

Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece um método para determinar se um sujeito com câncer é resistente ao tratamento com um medicamento anti-câncer, o método compreendendo:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio aqui descrito; e

(d) determinar se o sujeito é resistente ou sensível ao tratamento com o medicamento anti-câncer, comparando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência gerado na ausência do medicamento anti-câncer, ou na presença do medicamento anti-câncer em um estágio inicial.

Em uma modalidade preferida, o método para determinar se um sujeito com câncer é resistente ao tratamento com um medicamento anti-câncer compreende:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

---

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio compreendendo uma diluição em série de anticorpos de captura específicos para a proteína de fusão oncogênica, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido;

(d) comparar o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência gerado na ausência do medicamento anti-câncer, ou na presença do medicamento anti-câncer em um estágio inicial; e

(e) indicar se o sujeito é resistente ao tratamento com o medicamento anti-câncer quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica não foram mudados (por exemplo, não for substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão e/ou ativação de referência.

Em algumas modalidades, os métodos da presente invenção podem ser usados para auxiliar ou assistir na identificação de um sujeito com câncer, que é resistente ao tratamento com um medicamento anti-câncer, ou na determinação da probabilidade de um sujeito com câncer ser resistente ao tratamento com um medicamento anti-câncer, em que o sujeito apresenta um câncer tal como, por exemplo, uma malignidade hematológica. Em outras modalidades, os métodos da presente invenção podem ser usados para melhorar a identificação de um sujeito com câncer, que é resistente ao tratamento com um medicamento anti-câncer, ou na determinação da probabilidade de um sujeito com câncer ser resistente ao tratamento com um medicamento anti-câncer, em que o sujeito apresenta um câncer tal como, por exemplo, uma malignidade hematológica.

Em certas modalidades, o método compreende adicionalmente ou alternativamente a etapa de indicar se o sujeito é sensível ao tratamento com o medicamento anti-câncer, quando o nível de expressão e/ou ativação

---

(por exemplo, fosforilação) detectado para a proteína de fusão oncogênica é alterado (por exemplo, substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão ou ativação de referência. Os exemplos não limitantes de razões com as quais um sujeito com câncer pode ser resistente ao tratamento com um medicamento anti-câncer, incluem a presença de uma ou mais mutações na proteína de fusão oncogênica de interesse (por exemplo, BCR-ABL), não cumprimento do regime terapêutico, e/ou administração de uma dose de medicamento subideal. Com relação a uma dose de medicamento subideal do medicamento anti-câncer, o método pode compreender adicionalmente a etapa de aumentar a próxima dose ou dose subsequente do medicamento anti-câncer administrado ao sujeito. Em modalidades adicionais, uma ou mais moléculas de transdução de sinal presentes no extrato celular são detectadas, além de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, e o sujeito é identificado como resistente ou sensível ao tratamento com base neste "perfil molecular."

Em modalidades particulares, considera-se que o nível de expressão (por exemplo, total) e/ou o nível de ativação (por exemplo, fosforilação) da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, seja "alterado" na presença de um medicamento anti-câncer quando é pelo menos cerca de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, ou 95 % mais ou menos expresso ou ativado do que na ausência do medicamento anti-câncer. Em uma modalidade, considera-se que o nível de expressão (por exemplo, total) e/ou nível de ativação (por exemplo, fosforilação) da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, é "substancialmente diminuído" na presença de um medicamento anti-câncer quando é pelo menos cerca de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, ou 95 % menos expresso ou ativado do que na ausência do medicamento anti-câncer. Em modalidades adicionais, considera-se que o nível de expressão (por exemplo, total) e/ou nível de ativação (por exemplo, fosforilação) da proteína

de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, é "substancialmente diminuído" na presença de um medicamento anti-câncer (1) quando existe uma mudança a partir da expressão e/ou ativação elevada ou forte da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, sem o medicamento anti-câncer, para a expressão e/ou ativação média, fraca, baixa, ou muito fraca da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, com o medicamento anti-câncer, ou (2) quando existe uma mudança a partir da expressão e/ou ativação média da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, sem o medicamento anti-câncer, para a expressão e/ou ativação fraca, baixa, ou muito fraca da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, com o medicamento anti-câncer.

Em algumas modalidades, o nível de expressão e/ou nível de ativação da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, é expresso como um valor de unidade de fluorescência relativa (RFU) que corresponde à intensidade do sinal para um analito particular de interesse, que é determinado usando, por exemplo, um ensaio de proximidade tal como o imunoensaio de proximidade colaborativa (COPIA) aqui descrito. Em outras modalidades, o nível de expressão e/ou o nível de ativação da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, é expresso como "-", "±", "+", "++", "+++" ou "++++", o que corresponde no aumento da intensidade de sinal para um analito particular de interesse que é determinado usando, por exemplo, um ensaio de proximidade tal como COPIA. Em alguns exemplos, um nível de expressão ou ativação não detectável ou detectável minimamente de um analito particular de interesse, que é determinado usando, por exemplo, um ensaio de proximidade tal como COPIA, pode ser expresso as "-" ou "±". Em outros exemplos, um nível de expressão ou ativação baixo de um analito particular de interesse, que é determinado usando, por exemplo, um ensaio de proximidade tal como COPIA, pode ser

expresso como "+". Ainda em outros exemplos, um nível de expressão ou ativação moderado de um analito particular de interesse, que é determinado usando, por exemplo, um ensaio de proximidade tal como COPIA, pode ser expresso como "++". Ainda em outros exemplos, um nível de expressão ou ativação elevado de um analito particular de interesse, que é determinado usando, por exemplo, um ensaio de proximidade tal como COPIA, pode ser expresso como "+++". Em exemplos adicionais, um nível de expressão ou ativação muito elevado de um analito particular de interesse, que é determinado usando, por exemplo, um ensaio de proximidade tal como COPIA, pode ser expresso como "++++".

Ainda em outras modalidades, o nível de expressão e/ou o nível de ativação da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, é quantificado calibrando ou normalizando o valor de RFU, que é determinado usando, por exemplo, um ensaio de proximidade tal como COPIA, contra uma curva padrão gerada pelo analito particular de interesse. Em certos exemplos, um valor de unidades computacionais (CU) pode ser calculado com base na curva padrão. Em outros exemplos, o valor de CU pode ser expresso como "-", "±", "+", "++", "+++" ou "++++", de acordo com a descrição anterior para intensidade de sinal.

Em certas modalidades, o nível de expressão ou de ativação de um analito particular de interesse, quando expresso como "-", "±", "+", "++", "+++" ou "++++", pode corresponder a um nível de expressão ou ativação que é pelo menos cerca de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, ou 100 vezes maior ou menor (por exemplo, cerca de 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20, ou 5-50 vezes maior ou menor) do que um nível de expressão ou nível de ativação de referência, por exemplo, quando comparado a um controle negativo, tal como uma IgG controle, quando comparado a uma curva padrão gerada para o analito de interesse,

quando comparado a um controle positivo, tal como um controle pan-CK, quando comparado a um nível de expressão ou de ativação determinado na presença de um medicamento anti-câncer, e/ou quando comparado a um nível de expressão ou de ativação determinado na ausência de um medicamento anti-câncer. Em alguns exemplos, a correlação é específica para analito. Como um exemplo não limitante, um nível de expressão ou ativação "+", determinado usando, por exemplo, um ensaio de proximidade tal como COPIA, pode corresponder a um aumento de 2 vezes na expressão ou ativação para um analito e um aumento de 5 vezes para um outro analito, quando comparado a um nível de expressão ou o de ativação de referência.

Em modalidades particulares, tanto os níveis de proteína de fusão oncogênica total e ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, BCR-ABL), quanto da molécula de transdução de sinal, são medidos no extrato celular de acordo com os ensaios a base de anticorpo da presente invenção, e uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total), ou uma razão dos níveis de molécula de transdução de sinal ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína CRKL, JAK2, ou STAT5 fosfo/total), pode ser calculada e então comparada a uma mesma razão, calculada com base nos perfis de expressão e ativação de referência gerados na ausência do medicamento anti-câncer.

Em algumas modalidades, o nível de expressão ou de ativação da proteína de fusão oncogênica de referência, ou molécula de transdução de sinal, determinado na etapa (c) é obtido a partir de uma célula normal, tal como uma célula não cancerosa de um indivíduo saudável que não apresenta um câncer, tal como uma malignidade hematológica. Em outras certas modalidades, o nível de expressão ou de ativação da proteína de fusão oncogênica de referência, ou molécula de transdução de sinal, determinado na etapa (c) é obtido de uma célula

---

de tumor a partir de uma amostra (por exemplo, extrato celular) de um paciente com um câncer, tal como leucemia ou linfoma.

Em algumas modalidades, o nível de expressão ou de ativação da proteína de fusão oncogênica de referência, ou molécula de transdução de sinal, determinado na etapa (c) é obtido a partir de uma célula (por exemplo, uma célula tumoral obtida de uma amostra do paciente) que não é tratada com o medicamento anti-câncer. Em modalidades particulares, a célula que não é tratada com o medicamento anti-câncer é obtida da mesma amostra que a célula isolada (por exemplo, uma célula teste a ser investigada), usada para produzir o extrato celular, é obtida. Em certos exemplos, a presença de um nível de expressão ou ativação menor da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, comparado com o nível de expressão ou de ativação de referência indica que o medicamento anti-câncer é adequado para o tratamento do câncer (por exemplo, o tumor apresenta uma maior probabilidade de resposta ao medicamento anti-câncer). Em outros certos exemplos, a presença de um nível de expressão ou ativação idêntico, similar, ou maior da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, comparado com o nível de expressão ou de ativação de referência, indica que o medicamento anti-câncer é inadequado para o tratamento do câncer (por exemplo, o tumor apresenta uma menor probabilidade de resposta ao medicamento anti-câncer).

Em modalidades alternativas, o nível de expressão ou de ativação da proteína de fusão oncogênica de referência, ou molécula de transdução de sinal, determinado na etapa (c) é obtido a partir de uma célula sensível ao medicamento anti-câncer, que é tratada com o medicamento anti-câncer. Em tais modalidades, a presença de um nível de expressão ou ativação idêntico, similar ou inferior da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, comparado com o nível de expressão ou de ativação de referência, indica que o medicamento anti-câncer é adequado para o

---

tratamento do câncer (por exemplo, o tumor apresenta uma maior probabilidade de resposta ao medicamento anti-câncer). Em outras certas modalidades alternativas, o nível de expressão ou de ativação da proteína de fusão oncogênica de referência, ou de molécula de transdução de sinal, determinado na etapa (c) é obtido a partir de uma célula resistente ao medicamento anti-câncer, que é tratada com o medicamento anti-câncer. Em tais modalidades, a presença de um nível de expressão ou ativação idêntico, similar ou maior da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, comparado com o nível de expressão ou de ativação de referência, indica que o medicamento anti-câncer é inadequado para o tratamento do câncer (por exemplo, o tumor apresenta uma menor probabilidade de resposta ao medicamento anti-câncer).

Em certas modalidades, um maior nível de expressão ou ativação da proteína de fusão oncogênica, ou de molécula de transdução de sinal, determinado na etapa (c) é considerado como presente em um extrato celular quando o nível de expressão ou de ativação é pelo menos cerca de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, ou 100 vezes maior (por exemplo, cerca de 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20, ou 5-50 vezes maior) que o nível de expressão ou de ativação de referência do analito que corresponde em uma célula (por exemplo, uma célula cancerosa obtida de uma amostra de paciente) não tratada com o medicamento anti-câncer, em uma célula sensível ao medicamento anti-câncer, tratada com o medicamento anti-câncer, ou em uma célula resistente ao medicamento anti-câncer, tratada com o medicamento anti-câncer.

Em outras modalidades, um nível de expressão ou ativação menor da proteína de fusão oncogênica, ou da molécula de transdução de sinal, determinado na etapa (c) é considerado como presente em um extrato celular quando o nível de expressão ou de ativação é pelo menos cerca de 1,5,

2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, ou 100 vezes menor (por exemplo, cerca de 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20, ou 5-50 vezes menor) que o nível de expressão ou ativação de referência do analito que corresponde em uma célula (por exemplo, uma célula cancerosa obtida de uma amostra do paciente) não tratada com o medicamento anti-câncer, em uma célula sensível ao medicamento anti-câncer tratada com o medicamento anti-câncer, ou em uma célula resistente ao medicamento anti-câncer tratada com o medicamento anti-câncer.

#### 10 **A. Arranjos de anticorpo**

Em um aspecto, a presente invenção fornece um arranjo com faixa dinâmica superior compreendendo uma pluralidade de diluição em série de anticorpos de captura específicos para um ou mais analitos em um extrato celular, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido.

15 Em algumas modalidades, o extrato celular é preparado a partir de uma amostra de sangue total, urina, escarro, fluido do lavado brônquico, lágrima, aspirado de mama, linfa, saliva, e/ou aspirado por agulha fina (FNA) amostra. Como um exemplo não limitante, uma amostra de sangue total é primeiro separada em uma fração de plasma ou soro, e uma  
20 fração celular (isto é, precipitado celular). A fração celular contém tipicamente células vermelhas do sangue, células brancas do sangue (leucócitos), e/ou células circulantes de um tumor sólido, tais como células tumorais circulantes (CTCs), células endoteliais circulantes (CECs), células progenitoras endoteliais circulantes (CEPCs), células tronco cancerosas  
25 (CSCs) e combinações destas. As células isoladas presentes na fração celular podem ser lisadas, para transformar por meio disso as células isoladas em um extrato celular, por qualquer técnica conhecida na tecnologia.

Em alguns exemplos, o extrato celular compreende um extrato  
~~de células circulantes de um tumor sólido. As células circulantes são~~

tipicamente isoladas de uma amostra de paciente usando um ou mais métodos de separação incluindo, por exemplo, separação imunomagnética (ver, por exemplo, Racila et al., Proc. Natl. Acad. Set USA, 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth et al., Int. J. Cancer, 92:577-582 (2001)), separação microfluídica (ver, por exemplo, Mohamed et al., IEEE Trans. Nanobiosci., 3:251-256 (2004); Lin et al., Abstract No. 5147, 97<sup>a</sup> AACR Annual Meeting, Washington, D.C. (2006)), FACS (ver, por exemplo, Mancuso et al., Blood, 97:3658-3661 (2001)), centrifugação por gradiente de densidade (ver, por exemplo, Baker et al., Clin. Cancer Res., 13:4865-4871 (2003)), e métodos de diminuição (ver, por exemplo, Meye et al., Int. J. Oncol, 21:521-530 (2002)).

Em outros exemplos, o extrato celular compreende um extrato de leucócitos, tais como granulócitos (leucócitos polimorfonucleares), que incluem, por exemplo, neutrófilos, basófilos e eosinófilos, agranulócitos (leucócitos mononucleares) que incluem, por exemplo, células mononucleares do sangue periférico, tais como linfócitos e monócitos, e macrófagos e misturas destes. Os leucócitos podem ser isolados a partir do sangue total usando qualquer método de separação conhecido na técnica incluindo, por exemplo, centrifugação por gradiente de densidade Ficoll-HyPaque, lise hipotônica de células vermelhas do sangue, e o uso do meio de gradiente por densidade, tais como Lymphoprep™ e Polymorphprep™ (Axis-Shield; Oslo, Noruega).

Em certas modalidades, os leucócitos isolados, células circulantes ou outras células (por exemplo, células obtidas de um tumor sólido por meio de aspirado por agulha fina) podem ser estimulados *in vitro* com um ou mais fatores de crescimento antes, durante e/ou após a incubação com um ou mais medicamentos anti-câncer de interesse. Os fatores de crescimento estimulatórios incluem, mas sem limitação, fator de crescimento epidérmico (EGF), heregulina (HRG), TGF- $\alpha$ , PIGF, angiopoietina (Ang), NRG1, PGF, TNF- $\alpha$ , VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, citocinas e similares. Em outros exemplos, as células isoladas podem ser lisadas, por exemplo, após a

estimulação do fator de crescimento e/ou tratamento com medicamento anti-câncer, para produzir o extrato celular (por exemplo, lisado celular) usando qualquer técnica conhecida na tecnologia. Preferivelmente, a lise celular é iniciada entre cerca de 1-360 minutos após a estimulação do fator de crescimento, e mais preferivelmente em dois intervalos de tempo diferentes: (1) em cerca de 1-5 minutos após a estimulação do fator de crescimento; e (2) entre cerca de 30-180 minutos após a estimulação do fator de crescimento. Alternativamente, o lisado celular pode ser armazenado a -80 °C até o uso. Os protocolos para o isolamento, estímulo e lise de células circulantes são descritos na publicação PCT WO 2008/036802, que é aqui incorporada pela referência a sua íntegra, com todos os propósitos. Os protocolos para a preparação de extratos de célula tumoral a partir de tecido, biópsia ou culturas primárias são descritos na publicação PCT WO 2009/108637, que é aqui incorporada pela referência a sua íntegra, com todos os propósitos.

Em certas modalidades, o medicamento anti-câncer compreende um agente anti-sinalização (isto é, um medicamento citostático), tal como um anticorpo monoclonal ou um inibidor de tirosina quinase, um agente anti-proliferativo; um agente quimioterapêutico (isto é, um medicamento citotóxico), um agente terapêutico hormonal, um agente radioterapêutico, uma vacina, e/ou qualquer outro composto com a capacidade de reduzir ou anular o crescimento descontrolado de células anormais, tais como células cancerosas. Em algumas modalidades, as células isoladas são tratadas com um ou mais agentes anti-sinalização, agentes anti-proliferativos e/ou agentes terapêuticos hormonais, em combinação com pelo menos um agente quimioterapêutico.

Os exemplos de agentes anti-sinalização incluem, sem limitação, anticorpos monoclonais tais como trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>), alemtuzumab (Campath<sup>®</sup>), bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>), cetuximab (Erbix<sup>®</sup>), gemtuzumab (Mylotarg<sup>®</sup>), panitumumab (Vectibix<sup>™</sup>), rituximab (Rituxan<sup>®</sup>) e

tositumomab (BEXXAR<sup>®</sup>), inibidores de tirosina quinase tais como mesilato de imatinib (Gleevec<sup>®</sup>), nilotinib (Tasigna<sup>®</sup>), dasatinib (Sprycel<sup>®</sup>), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa<sup>®</sup>), sunitinib (Sutent<sup>®</sup>), erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>), lapatinib (GW-572016; Tykerb<sup>®</sup>), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PT 787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006; Nexavar<sup>®</sup>), leflunomide (SU101) e vandetanib (ZACTEVIA<sup>™</sup>; ZD6474), e combinações dos mesmos.

Os agentes anti-proliferativos exemplares incluem inibidores mTOR tais como sirolimus (rapamicina), temsirolimus (CCI-779) e everolimus (RAD001), inibidores de Akt tais como 1L6-hidroximetil-quirositol-2-(R)-2-O-metil-3-O-octadecil-sn-glicerocarboxilato, acetato de 9-metóxi-2-metil elipticínio, 1,3-di-hidro-1-(1-((4-(6-fenil-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalin-7-il)fenil)metil)-4-piperidinil)-2H-benzimidazol-2-ona, 10-(4'-(N-dietilamino)butil)-2-clorofenoxazina, 3-formilcromona tiosemicarbazona (complexo Cu(II)Cl<sub>2</sub>), API-2, um derivado de peptídeo 15-mer de aminoácidos 10-24 do proto-oncogene TCL1 (Hiromura et al., J. Biol. Chem., 279:53407-53418 (2004), KP372-1, e os compostos descritos em Kozikowski et al., J. Am. Chem. Soc, 125: 1144-1145 (2003) e Kau et al., Cancer Cell, 4:463-476 (2003) e combinações dos mesmos.

Os exemplos não limitantes de agentes quimioterapêuticos incluem medicamentos a base de platina (por exemplo, oxaliplatina, cisplatina, carboplatina, espiroplatina, iproplatina, satraplatina, etc.), agentes de alquilação (por exemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, corambucil, busulfan, melfalan, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosuréis, etc.), anti-metabólitos (por exemplo, 5-fluorouracil, azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, leucovorina, capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gencitabina (Gemzar<sup>®</sup>), pemetrexed (ALDVITA<sup>®</sup>), raltitrexed, etc.), alcalóides de planta (por exemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>), etc.),

inibidores de topoisomerase (por exemplo, irinotecan, topotecan, ansacrina, etoposida (VP16), fosfato de etoposida, teniposida, etc.), antibióticos anti-tumor (por exemplo, doxorubicina, adriamicina, daunorubicina, epirubicina, actinomicina, bleomicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, etc.), sais farmaceuticamente aceitáveis destes, estereoisômeros destes, derivados destes, análogos destes e combinações dos mesmos.

Exemplos de agentes terapêuticos hormonais incluem, sem limitação, inibidores de aromatase (por exemplo, aminoglutetimida, anastrozol (Arimidex<sup>®</sup>), letrozol (Femara<sup>®</sup>), vorozol, exemestano (Aromasin<sup>®</sup>), 4-androsteno-3,6,17-triona (6-OXO), 1,4,6-androstatrien-3,17-diona (ATD), formestano (Lentaron<sup>®</sup>), etc.), moduladores do receptor de estrogênio seletivo (por exemplo, bazedoxifeno, clomifeno, fulvestrant, lasofoxifeno, raloxifeno, tamoxifeno, toremifeno, etc.), esteróides (por exemplo, dexametasona), finasterida, e agonistas do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) tais como goserelina, sais farmaceuticamente aceitáveis destes, estereoisômeros destes, derivados destes, análogos destes e combinações dos mesmos.

Os exemplos não limitantes de vacinas contra câncer incluem ANYARA da Active Biotech, DCVax-LB da Northwest Biotherapeutics, EP-2101 da TDM Pharma, GV1001 da Pharmexa, IO-2055 da Idera Pharmaceuticals, INGN 225 da Introgen Therapeutics e Stimuvax da Biomira Merck.

Exemplos de agentes radioterapêuticos incluem, mas sem limitação, radionuclídeos tais como <sup>47</sup>Sc, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>89</sup>Sr, <sup>86</sup>Y, <sup>87</sup>Y, <sup>90</sup>Y, <sup>105</sup>Rh, <sup>111</sup>Ag, <sup>111</sup>In, <sup>117m</sup>Sn, <sup>149</sup>Pm, <sup>153</sup>Sm, <sup>166</sup>Ho, <sup>177</sup>Lu, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>211</sup>At e <sup>212</sup>Bi, opcionalmente conjugados com os anticorpos direcionados contra antígenos de tumor.

Em modalidades particulares, o um ou mais analitos presentes no extrato celular compreendem uma ou uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas, sozinhas ou em combinação com uma ou uma pluralidade

de moléculas de transdução de sinal. Os exemplos não limitantes de proteínas de fusão oncogênicas e moléculas de transdução de sinal de interesse são descritos anteriormente.

Em algumas modalidades, cada diluição em série de anticorpos de captura compreende uma série de concentrações decrescentes de anticorpo de captura. Em certos exemplos, os anticorpos de captura são diluídos em série pelo menos 2 vezes (por exemplo, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500, ou 1.000 vezes) para produzir uma diluição em série compreendendo um número ajustado (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, ou mais) de concentrações decrescentes de anticorpo de captura, que são identificadas no arranjo. Preferivelmente, pelo menos 2, 3, 4, 5, ou 6 réplicas de cada diluição de anticorpo de captura são identificadas no arranjo.

Em outras modalidades, o suporte sólido compreende vidro (por exemplo, uma lâmina de vidro), plástico, chipes, pinos, filtros, contas, papel, membrana (por exemplo, náilon, nitrocelulose, fluoreto de polivinilideno (PVDF), etc.), feixes de fibras, ou qualquer outro substrato adequado. Em uma modalidade preferida, os anticorpos de captura são limitados (por exemplo, por meio de interações covalentes ou não covalentes) em lâminas de vidro revestidas com um polímero de nitrocelulose tal como, por exemplo, lâminas FAST<sup>®</sup>, que são disponíveis comercialmente da Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

Como um exemplo não limitante, um microarranjo endereçável da presente invenção pode compreender uma diluição em série de anticorpo de captura para determinar o estado de ativação de BCR-ABL em um extrato celular, no qual o anticorpo de captura é direcionado para o domínio BCR da proteína de fusão BCR-ABL e os anticorpos de detecção (por exemplo, tanto os anticorpos dependentes do estado de ativação quanto os anticorpos independentes do estado de ativação) são direcionados para o domínio ABL. Em uma modalidade alternativa, tanto os anticorpos de captura

quanto os anticorpos independentes do estado de ativação são direcionados para o domínio BCR da proteína de fusão BCR-ABL, e o anticorpo dependente do estado de ativação é direcionado para o domínio ABL. Os arranjos podem compreender adicionalmente uma pluralidade de diferentes anticorpos de captura direcionados para as proteínas de fusão adicionais, e/ou moléculas de transdução de sinal em uma série de concentrações descendentes (isto é, diluições em série), em que os anticorpos de captura são acoplados à superfície do suporte sólido em diferentes locais endereçáveis.

Os versados na técnica entenderão que o arranjo pode ser qualquer configuração que permite sinalização discreta para cada uma das proteínas de fusão oncogênicas ativadas, e/ou moléculas de transdução de sinal a ser detectado. Por exemplo, o arranjo pode ser uma linha ou uma rede de regiões distintas (por exemplo, pontos ou manchas) na superfície do suporte, onde cada região contém um anticorpo de captura diferente ou agente de captura (isto é, se liga ao rótulo de captura presente no anticorpo de captura). O arranjo pode ser configurado para uso em métodos onde os estados de ativação de uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas e/ou moléculas de transdução de sinal são detectados em um ensaio multiplex simples. Em várias modalidades, a pluralidade compreende pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, ou mais proteínas de fusão oncogênicas e/ou moléculas de transdução de sinal. Em modalidades particulares, a pluralidade compreende a proteína de fusão BCR-ABL em combinação com pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, ou mais proteínas de fusão oncogênicas adicionais e/ou moléculas de transdução de sinal.

### **B. Ensaios de detecção de proximidade dupla**

Em aspectos particulares, os ensaios da presente invenção para detectar o estado de ativação de um analito particular de interesse em um extrato celular de leucócitos, ou outros tipos celulares, tais como células

circulantes de um tumor sólido, são um ensaio de proximidade multiplex de alto rendimento (isto é, três-anticorpos) com faixa dinâmica superior.

Como um exemplo não limitante, em situações onde o analito é uma proteína simples (por exemplo, EGFR), os três anticorpos usados no ensaio de proximidade podem compreender: (1) um anticorpo de captura específico para o analito; (2) um anticorpo de detecção específico para uma forma ativada do analito (isto é, anticorpo dependente do estado de ativação); e (3) um anticorpo de detecção que detecta a quantidade total do analito (isto é, anticorpo independente do estado de ativação). O anticorpo dependente do estado de ativação é capaz de detectar, por exemplo, a fosforilação, ubiquitinação, e/ou estado de complexação do analito. O anticorpo independente do estado de ativação é em geral capaz de detectar tanto as formas ativadas quanto não ativadas do analito.

Como um outro exemplo não limitante, em situações onde o analito é uma proteína de fusão (por exemplo, BCR-ABL), que contém um primeiro domínio que corresponde a uma proteína (por exemplo, BCR) que é fundida a um segundo domínio que corresponde a uma outra proteína (por exemplo, ABL), os três anticorpos usados no ensaio de proximidade podem compreender: (1) um anticorpo de captura específico para o primeiro domínio da proteína de fusão; (2) um anticorpo de detecção específico para uma forma ativada do segundo domínio da proteína de fusão (isto é, anticorpo dependente do estado de ativação); e (3) um anticorpo de detecção que detecta a quantidade total da proteína de fusão se ligando especificamente ao segundo domínio da proteína de fusão, independente de seu estado de ativação (isto é, anticorpo independente do estado de ativação). O anticorpo dependente do estado de ativação é capaz de detectar, por exemplo, a fosforilação, ubiquitinação, e/ou estado de complexação da proteína de fusão. O anticorpo independente do estado de ativação é em geral capaz de detectar tanto as formas ativadas quanto não ativadas da proteína de fusão.

---

Em um aspecto preferido, a presente invenção fornece um método para realizar um imunoensaio multiplex de alto rendimento com faixa dinâmica superior, o método compreendendo:

(a) incubar um extrato celular com uma ou uma pluralidade de diluição em série de anticorpos de captura, específicos para uma ou mais proteínas de fusão, para formar uma pluralidade de proteínas de fusão capturadas, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido, em que cada proteína de fusão compreende um primeiro domínio que corresponde a uma primeira proteína e um segundo domínio que corresponde a uma segunda proteína diferente, e em que os anticorpos de captura são específicos para o primeiro domínio das proteínas de fusão;

(b) incubar a pluralidade de proteínas de fusão capturadas com anticorpos de detecção, específicos para o segundo domínio das proteínas de fusão, para formar uma pluralidade de proteínas de fusão capturadas detectáveis, em que os anticorpos de detecção compreendem:

(1) uma pluralidade de anticorpos independentes do estado de ativação marcados com uma fração de facilitação, e

(2) uma pluralidade de anticorpos dependentes do estado de ativação marcados com um primeiro elemento de um par de amplificação de sinal, em que a fração de facilitação gera um agente de oxidação que canaliza e reage com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal;

(c) incubar a pluralidade de proteínas de fusão capturadas detectáveis com um segundo elemento do par de amplificação de sinal, para gerar um sinal amplificado, e

(d) detectar o sinal amplificado gerado a partir do primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal.

Em um aspecto alternativo, o método para realizar um imunoensaio multiplex de alto rendimento com faixa dinâmica superior compreende:

---

(a) incubar um extrato celular com uma ou uma pluralidade de diluição em série de anticorpos de captura, específicos para uma ou mais proteínas de fusão, para formar uma pluralidade de proteínas de fusão capturadas, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido, em que cada proteína de fusão compreende um primeiro domínio que corresponde a uma primeira proteína e um segundo domínio que corresponde a uma segunda proteína diferente, e em que os anticorpos de captura são específicos para o primeiro domínio das proteínas de fusão;

(b) incubar a pluralidade de proteínas de fusão capturadas com anticorpos de detecção para formar uma pluralidade de proteínas de fusão capturadas detectáveis, em que os anticorpos de detecção compreendem:

(1) uma pluralidade de anticorpos independentes do estado de ativação marcados com uma fração de facilitação, em que os anticorpos independentes do estado de ativação são específicos para o primeiro domínio das proteínas de fusão, e

(2) uma pluralidade de anticorpos dependentes do estado de ativação marcados com um primeiro elemento de um par de amplificação de sinal, em que os anticorpos dependentes do estado de ativação são específicos para o segundo domínio das proteínas de fusão,

em que a fração de facilitação gera um agente de oxidação que canaliza e reage com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal;

(c) incubar a pluralidade de proteínas de fusão capturadas detectáveis com um segundo elemento do par de amplificação de sinal, para gerar um sinal amplificado, e

(d) detectar o sinal amplificado gerado a partir do primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal.

Em um outro aspecto alternativo, o método para realizar um imunensaio multiplex de alto rendimento com faixa dinâmica superior compreende:

(a) incubar um extrato celular com uma ou uma pluralidade de diluição em série de anticorpos de captura, específicos para uma ou mais proteínas de fusão, para formar uma pluralidade de proteínas de fusão capturadas, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido, em que cada proteína de fusão compreende um primeiro domínio que corresponde a uma primeira proteína e um segundo domínio que corresponde a uma segunda proteína diferente, e em que os anticorpos de captura são específicos para o primeiro domínio das proteínas de fusão;

(b) incubar a pluralidade de proteínas de fusão capturadas com anticorpos de detecção para formar uma pluralidade de proteínas de fusão capturadas detectáveis, em que os anticorpos de detecção compreendem:

(1) uma pluralidade de anticorpos independentes do estado de ativação marcados com uma fração de facilitação, em que os anticorpos independentes do estado de ativação são específicos para a sequência, sítio, ou ponto de fusão entre o primeiro e segundo domínios das proteínas de fusão (isto é, anticorpos de ligação), e

(2) uma pluralidade de anticorpos dependentes do estado de ativação marcados com um primeiro elemento de um par de amplificação de sinal, em que os anticorpos dependentes do estado de ativação são específicos para o segundo domínio das proteínas de fusão,

em que a fração de facilitação gera um agente de oxidação que canaliza e reage com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal;

(c) incubar a pluralidade de proteínas de fusão capturadas detectáveis com um segundo elemento do par de amplificação de sinal, para gerar um sinal amplificado, e

(d) detectar o sinal amplificado gerado a partir do primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal.

Em certas modalidades, uma ou mais moléculas de transdução de sinal presentes no extrato celular são detectadas, além de uma ou mais

proteínas de fusão. Exemplos de moléculas de transdução de sinal de interesse são descritos anteriormente e incluem, sem limitação, receptor tirosina quinases, não receptor tirosina quinases e/ou componentes da cascata de sinalização de tirosina quinase. As moléculas de transdução de sinal podem ser detectadas usando os métodos aqui descritos, com a exceção de que todos os três anticorpos (isto é, o anticorpo de captura e ambos os anticorpos de detecção) são direcionados para a mesma proteína, ou usando qualquer método conhecido pelos versados na técnica. Além disso, as moléculas de transdução de sinal podem ser detectadas usando os ensaios de detecção simples (isto é, dois-anticorpos) descritos na publicação PCT WO 2008/036802, aqui incorporada pela referência na sua íntegra com todos os propósitos. Em modalidades particulares, uma ou mais das moléculas de transdução de sinal presentes no extrato celular são detectadas junto com uma ou mais proteínas de fusão usando o imunoensaio e arranjos aqui descritos.

Em alguns exemplos, o extrato celular é incubado com anticorpos de captura já limitados em um suporte sólido. Em outros exemplos, o extrato celular é incubado primeiro com anticorpos de captura em solução, e então colocado em contato com um suporte sólido para imobilizar os analitos capturados, por exemplo, por meio de rótulos de captura presentes nos anticorpos de captura que interagem com agentes de captura ligados no suporte sólido.

Em algumas modalidades, os anticorpos de detecção são incubados com analitos que estão ligados aos anticorpos de captura em solução ou limitados em um suporte sólido. Em certos exemplos, o extrato celular compreendendo uma pluralidade de analitos é incubado primeiro com os anticorpos de detecção em solução, e a seguir colocado em contato com anticorpos de captura em solução ou limitados em um suporte sólido. Em outros certos exemplos, o extrato celular compreendendo uma pluralidade de analitos é incubado primeiro com anticorpos de captura e anticorpos de

---

detecção em solução, e então colocado em contato com um suporte sólido para imobilizar os complexos anticorpo-analito, por exemplo, por meio de rótulos de captura presentes nos anticorpos de captura ou anticorpos de detecção que interagem com agentes de captura ligados no suporte sólido.

5 Antes da etapa de detecção, os complexos imobilizados podem ser lavados para remover anticorpos não complexados, os complexos lavados podem ser liberados sequencialmente a partir da superfície do suporte, e a canalização por proximidade com cada um dos analitos a ser ensaiado pode ser detectada por um método adequado, da maneira aqui descrita.

10 Em modalidades onde a superfície do suporte compreende agentes de captura limitados no arranjo, a etapa de incubação pode compreender colocar o extrato celular que compreende uma pluralidade de analitos em solução em contato com os anticorpos de captura e anticorpos de detecção, usando um excesso de todos os três anticorpos para direcionar a  
15 reação para finalização. Em uma variação do método, os complexos anticorpo-analito resultantes são afixados a uma fase sólida e lavados para remover anticorpos não ligados. Da maneira representada na figura 2 da publicação PCT WO 2008/036802, que é aqui incorporada pela referência na sua íntegra, com todos os propósitos, o anticorpo de captura 1 pode  
20 compreender um rótulo de captura 10. Os complexos são afixados a uma fase sólida 12 por meio de um agente de captura 11, que está aderido à fase sólida e se liga ao rótulo de captura, imobilizando por meio disso o complexo. O complexo imobilizado é lavado com um tampão adequado, e então liberado da fase sólida pela adição de um agente de liberação 13. O agente de liberação  
25 pode funcionar por qualquer mecanismo que resulte na liberação do complexo lavado. Em uma modalidade, o rótulo de captura compreende um sítio clivável que é reconhecido e clivado pelo agente de liberação. Em uma outra modalidade, representada na figura 2, o agente de liberação compete com o  
~~rótulo de captura para se ligar ao agente de captura. Por exemplo, o agente de~~

captura pode ser um primeiro oligonucleotídeo que hibridiza com um oligonucleotídeo parcialmente complementar (isto é, o rótulo de captura) afixado ao anticorpo de captura, e o agente de liberação pode ser um oligonucleotídeo que é totalmente complementar ao agente de captura, resultando em deslocamento de fita e liberação do complexo lavado a partir da fase sólida. Outros exemplos de rótulos de captura/agentes de captura/agentes de liberação adequados que podem ser usados incluem, mas sem limitação, 2,4-dinitrofenol (DNP)/anticorpo anti-DNP/2,4-DNP lisina, T2/ anticorpo anti-T3/T3, ouabaina/anticorpo anti-digoxina/digoxina e detiobiotina/estreptavidina/biotina (ver, por exemplo, Ishikawa et al., J. Clin. Lab Anal, 12:98-107 (1998)).

Após o complexo lavado ser liberado da fase sólida, ele é tanto: (1) colocado em contato com uma superfície do suporte compreendendo moléculas de captura limitadas no arranjo que liga especificamente rótulos de captura no anticorpo de captura, quanto (2) dissociado, e os anticorpos de detecção dissociados são colocados em contato com uma superfície do suporte compreendendo agentes de captura que ligam especificamente rótulos de captura nos anticorpos de detecção. A figura 2 da publicação PCT WO 2008/036802 representa a modalidade onde o complexo lavado é dissociado, e os anticorpos de detecção dissociados são colocados em contato com a superfície do suporte 14. A superfície do suporte compreende uma pluralidade de moléculas de captura limitadas em um arranjo "endereçável" ou "código de localização". Cada região distinta do arranjo compreende um agente de captura exclusivo 9 que se liga especificamente ao rótulo de captura 8 presente no anticorpo, independente do estado de ativação de detecção 2, ou ao anticorpo dependente do estado de ativação 3, limitando e organizando por meio disso os anticorpos de detecção marcados com rótulo no arranjo. Em uma modalidade preferida, os agentes de captura e rótulos de captura são oligonucleotídeos que hibridizam

- especificamente uns nos outros. Os arranjos endereçáveis compreendendo
- moléculas de captura de oligonucleotídeo também são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Keramas et al., *Lab Chip*, 4:152-158 (2004); Delrio-Lafreniere et al., *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 48:23-31 (2004)).

5                   A presença dos anticorpos de detecção em cada região distinta do arranjo pode ser detectada direta ou indiretamente com uma fração, tal como uma fração de facilitação ou um primeiro elemento de um par de amplificação de sinal. Exemplos de frações que podem ser detectadas diretamente incluem fluoróforos, cromóforos, ouro coloidal, látex colorido,

10                   etc. Em uma modalidade, ambas as frações são selecionadas independentemente com fluoróforos. Qualquer par de fluoróforos que fornece uma leitura distinguível, embora em muita proximidade um com o outro, pode ser usado tal como, por exemplo, Cy3/Cy5, Cy5/ficoertrina e similares. Alternativamente, se um arranjo direcionável de oligonucleotídeo for usado,

15                   ambas as frações podem ter o mesmo fluoróforo distribuído em diferentes códigos de localização. A microscopia confocal de varredura a laser pode ser usada para detectar frações de fluoróforo que são aderidas no arranjo. Em ensaios onde os complexos são liberados do arranjo antes da detecção, tais como em ensaios de deslocamento de fitas, os métodos adequados para

20                   detectar as frações de fluoróforo incluem fluorescência induzida a laser confocal por fluxo capilar, nano-HPLC, eletroforese micro-capilar, etc.

                  Em algumas modalidades, os anticorpos independentes do estado de ativação compreendem adicionalmente uma fração detectável. Em tais exemplos, a quantidade da fração detectável está correlacionada com a

25                   quantidade de um ou mais dos analitos no extrato celular. Exemplos de frações detectáveis incluem, mas sem limitação, marcas fluorescentes, marcas quimicamente reativas, marcas enzimáticas, marcas radioativas e similares. Preferivelmente, a fração detectável é um fluoróforo tal como um corante Alexa Fluor<sup>®</sup> (por exemplo, Alexa Fluor<sup>®</sup> 647), fluoresceína, isotiocianato de

---

fluoresceína (FITC), Oregon Green™; rodamina, vermelho do Texas, isotiocinato de tetra-rodamina (TRITC), um flúor CyDye™ (por exemplo, Cy2, Cy3, Cy5) e similares. A fração detectável pode ser acoplada direta ou indiretamente aos anticorpos independente do estado de ativação, usando os métodos bem conhecidos na técnica.

Em certos exemplos, os anticorpos independentes do estado de ativação são marcados diretamente com a fração de facilitação. A fração de facilitação pode ser acoplada aos anticorpos independentes do estado de ativação usando os métodos bem conhecidos na técnica. Uma fração de facilitação adequada para uso na presente invenção inclui qualquer molécula capaz de gerar uma agente de oxidação que canaliza (isto é, é direcionado para) e reage com (isto é, liga-se, é ligado por, ou forma um complexo com) uma outra molécula em proximidade (isto é, espacialmente próximo ou perto) com a fração de facilitação. Exemplos de frações de facilitação incluem, sem limitação, enzimas tal como glicose oxidase (GO) ou qualquer outra enzima que catalisa uma reação de oxidação/redução que envolve o oxigênio molecular ( $O_2$ ) como um aceptor de elétrons, e fotossintetizadores tais como azul de metileno, rosa bengala, porfirinas, corantes escurato, ftalocianinas e similares. Os exemplos não limitantes de agentes de oxidação incluem peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), um oxigênio simples, e qualquer outro composto que transfere átomos de oxigênio ou ganha elétrons em uma reação de oxidação/redução. Preferivelmente, na presença de um substrato adequado (por exemplo, glicose, luz, etc.), a fração de facilitação (por exemplo, glicose oxidase, fotossensibilizador, etc.) gera um agente de oxidação (por exemplo, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio simples, etc.) que canaliza e reage com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre (HRP), hapteno protegido por um grupo protetor, uma enzima inativada por ligação tioéter a um inibidor de enzima, etc.), quando as duas frações estão em proximidade uma com a outra.

A preparação de moléculas de dextrano modificadas por sulfidrila e seu uso na preparação de conjugados entre um anticorpo e uma fração de facilitação, tal como glicose oxidase (GO), é descrita na publicação PCT WO 2009/108637, que é aqui incorporada pela referência na sua íntegra, com todos os propósitos.

Em outros certos exemplos, os anticorpos independentes do estado de ativação são marcados indiretamente com a fração de facilitação, por meio de hibridização entre um oligonucleotídeo ligante conjugado com os anticorpos independentes do estado de ativação, e um oligonucleotídeo ligante complementar conjugado com a fração de facilitação. Os oligonucleotídeos ligantes podem ser acoplados à fração de facilitação ou aos anticorpos independentes do estado de ativação usando os métodos bem conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo ligante conjugado na fração de facilitação apresenta 100 % de complementaridade com o oligonucleotídeo ligante conjugado nos anticorpos independentes do estado de ativação. Em outras modalidades, o par de oligonucleotídeo ligante compreende pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, ou mais regiões de pareamento imperfeito, por exemplo, mediante hibridização em condições de hibridização restritiva. Os versados na técnica entenderão que os anticorpos independentes do estado de ativação, específicos para diferentes analitos, podem ser tanto conjugados no mesmo oligonucleotídeo ligante quanto em diferentes oligonucleotídeos ligantes.

O tamanho dos oligonucleotídeos ligantes que são conjugados na fração de facilitação ou nos anticorpos independentes do estado de ativação pode variar. Em geral, a sequência ligante pode ter pelo menos cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, ou 100 nucleotídeos em tamanho. Tipicamente, as sequências aleatórias de ácidos nucleicos são geradas por acoplamento. Como um exemplo não limitante, uma biblioteca de oligonucleotídeos ligantes pode ser determinada para apresentar três domínios

---

contíguos distintos: um domínio espaçador, domínio de assinatura e domínio de conjugação. Preferivelmente, os oligonucleotídeos ligantes são determinados por acoplamento eficiente sem prejudicar a função da fração de facilitação ou anticorpos independentes do estado de ativação, nos quais são conjugados.

As sequências de oligonucleotídeos ligantes podem ser determinadas para prevenir ou minimizar qualquer formação de estrutura secundária em uma variedade de condições de ensaio. As temperaturas de fusão são tipicamente monitoradas de maneira cuidadosa, para cada segmento no ligante, para permitir sua participação em todos os procedimentos do ensaio. Em geral, a faixa de temperatura de fusão do segmento da sequência ligante não é maior que 5 °C. Os algoritmos de computador (por exemplo, OLIGO 6.0) para determinar a temperatura de fusão, estrutura secundária, e estrutura do tipo alça, em concentrações iônicas definidas, podem ser usados para analisar cada um dos três domínios diferentes em cada ligante. As sequências completas combinadas também podem ser analisadas com relação à sua caracterização estrutural e sua comparabilidade com outras sequências de oligonucleotídeos ligantes conjugados, por exemplo, se elas hibridizarem em condições de hibridização restritiva em um oligonucleotídeo ligante complementar.

A região espaçadora do oligonucleotídeo ligante fornece separação adequada do domínio de conjugação do sítio de reticulação do oligonucleotídeo. O domínio de conjugação funciona para ligar moléculas marcadas com uma sequência complementar de oligonucleotídeos ligantes no domínio de conjugação por meio da hibridização de ácido nucleico. A hibridização mediada por ácido nucleico pode ser realizada tanto antes quanto após a formação do complexo anticorpo-analito (isto é, antígeno), fornecendo um formato de ensaio mais flexível. Ao contrário de muitos métodos de conjugação direta de anticorpo, os oligonucleotídeos relativamente pequenos

---

que se ligam aos anticorpos ou outras moléculas apresentam impacto mínimo na afinidade específica de anticorpos em seu analito alvo ou na função das moléculas conjugadas.

Em algumas modalidades, o domínio de sequência de assinatura do oligonucleotídeo ligante pode ser usado em um complexo de ensaios de proteína multiplexada. Os múltiplos anticorpos podem ser conjugados com oligonucleotídeos ligantes com diferentes sequências de assinatura. Em imunoenaios multiplex, as sequências de oligonucleotídeos repórteres marcadas com sondas apropriadas podem ser usadas para detectar hibridização cruzada entre anticorpos e seus antígenos no formato de ensaio multiplex.

Os oligonucleotídeos ligantes podem ser conjugados aos anticorpos ou outras moléculas usando vários métodos diferentes. Por exemplo, os oligonucleotídeos ligantes podem ser sintetizados com um grupo tiol tanto na extremidade 5' quanto 3'. O grupo tiol pode ser desprotegido usando agentes de redução (por exemplo, TCEP-HCl) e os ligantes resultantes podem ser purificados usando uma coluna de dessalinização com rotação. Os oligonucleotídeos ligantes desprotegidos resultantes podem ser conjugados com as aminas primárias de anticorpos, ou outros tipos de proteínas, usando reticuladores heterobifuncionais tal como SMCC. Alternativamente, os grupos 5'-fosfato em oligonucleotídeos podem ser tratados com carbodiimida EDC solúvel em água para formar ésteres de fosfato, e ser subsequentemente acoplados à moléculas que contém amina. Em certos exemplos, o diol no resíduo 3'-ribose pode ser oxidado em grupos aldeído e então conjugados aos grupos amina de anticorpos, ou outros tipos de proteínas, usando aminação redutiva. Em outros certos exemplos, o oligonucleotídeo ligante pode ser sintetizado com uma modificação de biotina tanto na extremidade 3' quanto 5' e conjugado com moléculas marcadas com estreptavidina.

---

Os oligonucleotídeos ligantes podem ser sintetizados usando qualquer de uma variedade de técnicas conhecidas na tecnologia, tais como aquelas descritas em Usman et al., J. Am. Chem. Soc, 109:7845 (1987); Scaringe et al., Nucl. Acids Res., 18:5433 (1990); Wincott et al., Nucl. Acids Res., 23:2677-2684 (1995); e Wincott et al., Methods Mol Bio., 74:59 (1997). Em geral, a síntese de oligonucleotídeos usa grupos de proteção e de acoplamento de ácido nucleico comuns, tais como dimetoxitritil na extremidade 5' e fosforamiditas na extremidade 3'. Os reagentes adequados para síntese de oligonucleotídeo, métodos para desproteção de ácido nucleico, e métodos para purificação de ácido nucleico são conhecidos pelos versados na técnica.

A preparação e uso dos anticorpos conjugados ao oligonucleotídeo para detecção simultânea de analitos totais e fosforilados é descrita na publicação PCT WO 2008/036802, que é aqui incorporada pela referência na sua íntegra, com todos os propósitos.

Em certos exemplos, os anticorpos dependentes do estado de ativação são marcados diretamente com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal. O elemento do par de amplificação de sinal pode ser acoplado aos anticorpos dependentes do estado de ativação usando os métodos bem conhecidos na técnica. Em outros certos exemplos, os anticorpos dependentes do estado de ativação são marcados indiretamente com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal, por meio de ligação entre um primeiro elemento de um par de ligação conjugado com os anticorpos dependentes do estado de ativação e um segundo elemento do par de ligação conjugado com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal. Os elementos do par de ligação (por exemplo, biotina/estreptavidina) podem ser acoplados ao elemento do par de amplificação de sinal, ou aos anticorpos dependentes do estado de ativação, usando os métodos bem conhecidos na técnica. Exemplos de elementos de par de amplificação de sinal incluem, mas sem limitação, peroxidases tais como peroxidase de rábano

---

silvestre (HRP), catalase, cloroperoxidase, citocromo, peroxidase, eosinófilo peroxidase, glutathione peroxidase, lactoperoxidase, mieloperoxidase, tireóide peroxidase, deiodinase e similares. Outros exemplos de elementos de par de amplificação de sinal incluem haptenos protegidos por um grupo protetor e enzimas inativadas por ligação tioéter a um inibidor de enzima.

Os anticorpos de captura, anticorpos independentes do estado de ativação, e anticorpos dependentes do estado de ativação são tipicamente selecionados para minimizar a competição entre eles, com relação à ligação do analito (isto é, todos os anticorpos podem se ligar simultaneamente às suas proteínas de fusão ou moléculas de transdução de sinal correspondentes).

Em um exemplo de canalização por proximidade, a fração de facilitação é glicose oxidase (GO) e o primeiro elemento do par de amplificação de sinal é peroxidase de rábano silvestre (HRP). Quando a GO é colocado em contato com um substrato tal como glicose, gera um agente de oxidação (isto é, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )). Se HRP estiver em canalização por proximidade com o GO, o  $H_2O_2$  gerado pelo GO é canalizado e complexa com a HRP para formar um complexa HRP- $H_2O_2$  que, na presença do segundo elemento do par de amplificação de sinal (por exemplo, um substrato quimioluminescente, tal como luminol ou isoluminol, ou um substrato fluorogênico tal como tiramida (por exemplo, biotina-tiramida), ácido homovanílico, ou ácido 4-hidroxifenil acético), gera um sinal amplificado. Os métodos de usar GO e HRP em um ensaio de proximidade são descritos, por exemplo, em Langry et al., U.S. Dept. de Energy Report No. UCRL-ID- 136797 (1999). Quando biotina-tiramida é usada como o segundo elemento do par de amplificação de sinal, o complexa HRP- $H_2O_2$  oxida a tiramida para gerar um radical de tiramida reativa que se liga covalentemente próximo aos resíduos nucleofílicos. A tiramida ativada é tanto detectada diretamente quanto detectada mediante a adição de um reagente de detecção de sinal tal como, por exemplo, um fluoróforo marcado com

estreptavidina ou uma combinação de uma peroxidase marcada com estreptavidina e um reagente cromogênico. Exemplos de fluoróforos adequados para uso na presente invenção incluem, mas sem limitação, um corante Alexa Fluor<sup>®</sup> (por exemplo, Alexa Fluor<sup>®</sup> 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green<sup>™</sup>; rodamina, vermelho Texas, isotiocianato de tetra-rodamina (TRITC), um flúor CyDye<sup>™</sup> (por exemplo, Cy2, Cy3, Cy5) e similares. A marca com estreptavidina pode ser acoplada direta ou indiretamente no fluoróforo ou peroxidase usando os métodos bem conhecidos na técnica. Os exemplos não limitantes de reagente cromogênicos adequados para uso na presente invenção incluem 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), 3,3'-diaminobenzidina (DAB), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), 4-cloro-1-naptol (4CN) e/ou porfirinogênio.

Em um outro exemplo de canalização por proximidade, a fração de facilitação é um fotossensibilizador, e o primeiro elemento do par de amplificação de sinal é uma grande molécula marcada com múltiplos haptenos que são protegidos por grupos protetores, que previnem a ligação dos haptenos a um parceiro de ligação específico (por exemplo, ligante, anticorpo, etc.). Por exemplo, o elemento do par de amplificação de sinal pode ser uma molécula de dextrano marcada com moléculas de biotina protegida, coumarina e/ou fluoresceína. Os grupos protetores adequados incluem, mas sem limitação, grupos protetores de fenóxi, analino, olefina, tioéter, e selenoéter. Os fotossensibilizadores adicionais e moléculas protegidas de hapteno, adequados para uso nos ensaios de proximidade da presente invenção, são descritos na patente U.S. 5.807.675. Quando o fotossensibilizador é excitado com luz, gera um agente de oxidação (isto é, oxigênio simples). Se as moléculas de hapteno estiverem em canalização por proximidade com o fotossensibilizador, o oxigênio simples gerado pelo fotossensibilizador é canalizado e reage com tioéteres nos grupos protetores

dos haptenos para produzir grupos carbonila (cetonas ou aldeídos) e ácido sulfinico, liberando os grupos protetores dos haptenos. Os haptenos não protegidos ficam então disponíveis para se ligar especificamente no segundo elemento do par de amplificação de sinal (por exemplo, um parceiro de  
5 ligação específico que pode gerar um sinal detectável). Por exemplo, quando o hapteno é biotina, o parceiro de ligação específico pode ser uma estreptavidina marcada com uma enzima. As enzimas exemplares incluem fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase, HRP, etc. Após a lavagem para remover reagentes não ligados, o sinal detectável pode ser gerado adicionando um  
10 substrato detectável (por exemplo, fluorescente, quimioluminescente, cromogênico, etc.) da enzima, e ser detectado usando métodos adequados e instrumentação conhecida na técnica. Alternativamente, o sinal detectável pode ser amplificado usando amplificação de sinal de tiramida, e a tiramida ativada pode ser detectada tanto diretamente quanto detectada mediante  
15 adição de um reagente de detecção de sinal, da maneira descrita anteriormente.

Ainda em um outro exemplo de canalização por proximidade, a fração de facilitação é um fotossensibilizador, e o primeiro elemento do par de amplificação de sinal é um complexo enzima-inibidor. A enzima e o  
20 inibidor (por exemplo, dextrano marcado com ácido fosfônico) são ligados juntos por um ligante clivável (por exemplo, tioéter). Quando o fotossensibilizador é excitado com a luz, gera um agente de oxidação (isto é, oxigênio simples). Se o complexo enzima-inibidor estiver em canalização por proximidade com o fotossensibilizador, o oxigênio simples gerado pelo  
25 fotossensibilizador é canalizado e reage com o ligante clivável, liberando o inibidor da enzima, ativando por meio disso a enzima. Um substrato de enzima é adicionado para gerar um sinal detectável ou, alternativamente, um reagente de amplificação é adicionado para gerar um sinal amplificado.

---

Em um exemplo adicional de canalização por proximidade, a fração de facilitação é HRP, o primeiro elemento do par de amplificação de sinal é um hapteno protegido ou um complexo enzima-inibidor da maneira descrita anteriormente, e os grupos protetores compreendem p-alcóxi fenol. A  
5 adição de fenilenodiamina e  $H_2O_2$  gera uma fenilenodiimina reativa que canaliza no hapteno protegido ou no complexo enzima-inibidor, e reage com grupos protetores p-alcóxi fenol para produzir haptenos expostos ou uma enzima reativa. O sinal amplificado é gerado e detectado da maneira descrita anteriormente (ver, por exemplo, patente U.S. 5.532.138 e 5.445.944).

10 Os versados na técnica entenderão que parceiros de ligação, sem ser os anticorpos, podem ser usados para imobilizar e/ou detectar um ou mais analitos de um extrato celular de acordo com os ensaios de proximidade (isto é, três-anticorpos) aqui descritos. Os exemplos não limitantes de tais  
- parceiros de ligação incluem ligantes ou receptores do analito, substratos do analito, domínios de ligação (por exemplo, PTB, SH2, etc.), aptâmeros e  
15 similares.

Um protocolo exemplar para realizar os ensaios de proximidade aqui descritos é fornecido no exemplo 1.

Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece estojos  
20 para realizar os ensaios de proximidade descritos anteriormente compreendendo: (a) uma diluição em série de uma pluralidade de anticorpos de captura limitados em um suporte sólido e (b) uma pluralidade de anticorpos de detecção (por exemplo, anticorpos independentes do estado de ativação e anticorpos dependentes do estado de ativação). Em alguns  
25 exemplos, os estojos podem conter adicionalmente instruções para métodos de usar o estojo para detectar os estados de ativação de uma ou uma pluralidade de proteínas de fusão, e/ou moléculas de transdução de sinal. Os estojos também podem conter qualquer dos reagentes adicionais descritos  
~~anteriormente, com relação à realização dos métodos específicos da presente~~

invenção, tais como, por exemplo, primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal, reagentes de amplificação de sinal de tiramida, substratos para a fração de facilitação, tampões de lavagem, etc.

#### **IV. Construção de arranjos de anticorpo**

5                   Em certos aspectos, a presente invenção fornece arranjos a base de anticorpo para detectar o estado de ativação de uma ou uma pluralidade de proteínas de fusão, em um extrato celular, usando uma diluição em série de anticorpos de captura limitados em um suporte sólido. Os arranjos usados nos ensaios da presente invenção compreendem tipicamente uma  
10 pluralidade de um ou mais diferentes anticorpos de captura, em uma faixa de concentrações de anticorpo de captura que são acoplados na superfície de um suporte sólido em diferentes locais endereçáveis.

                  O suporte sólido pode compreender qualquer substrato adequado para imobilizar proteínas. Os exemplos de suportes sólidos incluem,  
15 mas sem limitação, vidro (por exemplo, uma lâmina de vidro), plástico, chipes, pinos, filtros, contas (por exemplo, contas magnéticas, contas de poliestireno, etc.), papel, membranas, feixes de fibras, géis, metal, cerâmicas e similares. Membranas, tais como as de náilon (Biotrans™, ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA); Zeta-Probe®, Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)),  
20 nitrocelulose (Protran®, Whatman Inc. (Florham Park, NJ)) e PVDF (Immobilon™, Millipore Corp. (Billerica, MA)), são adequadas para uso como suportes sólidos nos arranjos da presente invenção. Preferivelmente, os anticorpos de captura são limitados em lâminas de vidro revestidas com um polímero de nitrocelulose, por exemplo, lâminas FAST®, que são disponíveis  
25 comercialmente pela Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

Os aspectos particulares do suporte sólido que são desejáveis incluem a capacidade de se ligar a grandes quantidades de anticorpos de captura, a capacidade de se ligar aos anticorpos de captura com desnaturação mínima, e a incapacidade de se ligar à outras proteínas. Um outro aspecto

---

adequado é que o suporte sólido possa exibir "capilaridade" mínima quando as soluções de anticorpo que contém anticorpos de captura forem aplicadas no suporte. Um suporte sólido com capilaridade mínima permite que pequenas alíquotas de solução de anticorpo de captura aplicadas no suporte resultem em  
5 manchas pequenas e definidas de anticorpo imobilizado de captura.

Os anticorpos de captura são tipicamente limitados direta ou indiretamente (por exemplo, por meio de rótulos de captura) no suporte sólido por meio de interações covalentes ou não covalentes (por exemplo, ligações iônicas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de Van der  
10 Waals, ligações dipolo-dipolo). Em algumas modalidades, os anticorpos de captura são afixados covalentemente no suporte sólido usando um reticulador homobifuncional ou heterobifuncional, usando métodos e condições de reticulação padrão. Os reticuladores adequados são disponíveis  
comercialmente de fornecedores tal como, por exemplo, Pierce Biotechnology  
15 (Rockford, IL).

Os métodos para gerar os arranjos da presente invenção incluem, mas sem limitação, qualquer técnica usada para construir arranjos de proteína ou ácido nucleico. Em algumas modalidades, os anticorpos de captura são identificados em um arranjo usando um microidentificador, que  
20 são tipicamente impressoras robóticas equipadas com pinos divididos, pinos cegos ou impressões. Os sistemas robóticos adequados para imprimir os arranjos de anticorpo aqui descritos incluem o robô PixSys 5000 (Cartesian Technologies; Irvine, CA) com pinos divididos ChipMaker2 (TeleChem International; Sunnyvale, CA), bem como outras impressoras robóticas  
25 disponíveis pela BioRobics (Woburn, MA) e Packard Instrument Co. (Meriden, CT). Preferivelmente, pelo menos 2, 3, 4, 5, ou 6 réplicas de cada diluição de anticorpo de captura são identificadas no arranjo.

Um outro método para gerar os arranjos de anticorpo da  
~~presente invenção compreende dispensar um volume conhecido de uma~~

---

diluição de anticorpo de captura em cada posição do arranjo selecionado, colocando um dispensador de capilar em um suporte sólido nas condições eficientes para puxar um volume de líquido definido no suporte, em que este processo é repetido usando diluições de anticorpo de captura selecionado em  
5 cada posição de arranjo selecionado para criar um arranjo completo. O método pode ser praticado para formar uma pluralidade de tais arranjos, onde a etapa de deposição de solução é aplicada a uma posição selecionada em cada um de uma pluralidade de suportes sólidos, em cada ciclo repetido. Uma descrição adicional de um método como este pode ser encontrada, por  
10 exemplo, na patente U.S. 5.807.522.

Em certos exemplos, os dispositivos para impressão em papel podem ser usados para gerar os arranjos de anticorpo da presente invenção. Por exemplo, a diluição do anticorpo de captura desejado pode ser carregada na cabeça de impressão de uma impressora jato de tinta doméstica e impressa  
15 em um suporte sólido adequado (ver, por exemplo, Silzel et al., Clin. Chem., 44:2036-2043 (1998)).

Em algumas modalidades, o arranjo gerado no suporte sólido apresenta uma densidade de pelo menos cerca de 5 pontos/cm<sup>2</sup>, e preferivelmente pelo menos cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100,  
20 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000 ou 9.000, ou 10.000 pontos/cm<sup>2</sup>.

Em certos exemplos, os pontos no suporte sólido representam  
25 cada qual um anticorpo de captura diferente. Em outros certos exemplos, pontos múltiplos no suporte sólido representam o mesmo anticorpo de captura, por exemplo, como uma diluição em série que compreende uma série de concentrações decrescentes de anticorpo de captura.

---

Os exemplos adicionais de métodos para preparar e construir arranjos de anticorpo em suportes sólidos são descritos nas patentes U.S. 6.197.599, 6.777.239, 6.780.582, 6.897.073, 7.179.638 e 7.192.720, publicações de patente U.S. 20060115810, 20060263837, 20060292680 e 5 20070054326; e Varnum et al., *Methods Mol. Biol.*, 264: 161-172 (2004).

Os métodos para examinar os arranjos de anticorpo são conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, qualquer técnica usada para examinar os arranjos de proteína ou ácido nucleico. Os examinadores de microarranjo adequados para uso na presente invenção são disponíveis a partir 10 de PerkinElmer (Boston, MA), Agilent Technologies (Palo Alto, CA), Applied Precision (Issaquah, WA), GSI Lumonics Inc. (Billerica, MA), e Axon Instruments (Union City, CA). Como um exemplo não limitante, um GSI ScanArray 3000 para detecção de fluorescência pode ser usado com software ImaGene para quantificação.

## 15 **V. Seleção de medicamento e otimização para terapia de câncer**

Em certos aspectos, a presente invenção fornece métodos para a seleção de terapias apropriadas para infrarregular ou interromper uma ou mais vias de sinalização desreguladas. Em outros certos aspectos, a presente 20 invenção fornece métodos para otimizar a terapia e/ou reduzir a toxicidade em um sujeito com câncer e que recebe um período de terapia para o tratamento de câncer. Assim, a presente invenção pode ser usada para facilitar a determinação de terapias personalizadas, com base na assinatura molecular particular fornecida pela coleção de proteínas de fusão oncogênicas ativadas 25 e/ou proteínas de transdução de sinal em um dado câncer ou tumor do paciente.

Dessa maneira, em um aspecto particular, a presente invenção fornece um método para otimizar a terapia e/ou reduzir a toxicidade em um

---

sujeito com câncer, e que recebe um período de terapia para o tratamento de câncer, o método compreendendo:

- (a) isolar células de câncer após a administração de um medicamento anti-câncer (por exemplo, um ou mais inibidores de tirosina quinase tal como Gleevec<sup>®</sup>, Tassigna<sup>®</sup>, Sprycel<sup>®</sup>, etc.);
- (b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;
- (c) medir um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio aqui descrito; e
- (d) comparar o nível medido de expressão e/ou ativação da proteína de fusão oncogênica com um nível de expressão e/ou ativação da proteína de fusão oncogênica, medido em um momento anterior, durante o período da terapia; e
- (e) determinar uma dose subsequente do período da terapia para o sujeito, ou se um período da terapia diferente pode ser administrado ao sujeito com base na comparação da etapa (d).

Em modalidades particulares, tanto os níveis de proteína de fusão oncogênica total quanto ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, BCR-ABL) são medidos no extrato celular, de acordo com os ensaios a base de anticorpo da presente invenção, e uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) pode ser calculada e usada para avaliar o período da terapia para um sujeito, por exemplo, comparando a razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica fosfo/total com uma mesma razão calculada para o sujeito em um estágio inicial (por exemplo, em um estágio inicial, embora em terapia com medicamento anti-câncer, ou em um período de tempo antes da terapia com medicamento anti-câncer).

Em um aspecto relacionado, a presente invenção fornece um ~~método para otimizar a terapia e/ou reduzir a toxicidade em um sujeito com~~

---

câncer, e que recebe um período de terapia para o tratamento de câncer, o método compreendendo:

5 (a) isolar células de câncer após a administração de um medicamento anti-câncer (por exemplo, um ou mais inibidores de tirosina quinase tal como Gleevec<sup>®</sup>, Tasigna<sup>®</sup>, Sprycel<sup>®</sup>, etc.);

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

10 (c) medir um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica e uma ou mais moléculas de transdução de sinal em sua via no extrato celular, usando um ensaio aqui descrito; e

(d) comparar o nível medido de expressão e/ou ativação da proteína de fusão oncogênica e moléculas de transdução de sinal com um nível de expressão e/ou ativação da proteína de fusão oncogênica e moléculas de transdução de sinal, medido em um momento inicial durante o período da  
15 terapia; e

(e) determinar uma dose subsequente do período da terapia para o sujeito, ou se um período da terapia diferente pode ser administrado ao sujeito com base na comparação da etapa (d).

20 Em modalidades particulares, tanto os níveis de proteína de fusão oncogênica total quanto ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, BCR-ABL), e os níveis de componente da via de transdução de sinal (por exemplo, CRKL, JAK2, STAT5), são medidos no extrato celular, de acordo com os ensaios a base de anticorpo da presente invenção, e uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por  
25 exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) e uma razão de níveis de componente da via de transdução de sinal total para ativado (por exemplo, razão dos níveis de proteína CRKL, JAK2, ou STAT5 fosfo/total) podem ser calculadas e usadas para avaliar o período da terapia para um  
~~sujeito, por exemplo, comparando a razão dos níveis de proteína de fusão~~

---

oncogênica fosfo/total, e do componente da via de transdução de sinal, com uma mesma razão calculada para o sujeito em um estágio inicial (por exemplo, em um estágio inicial, embora em terapia com medicamento anti-câncer, ou em um período de tempo antes da terapia com medicamento anti-câncer).

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para selecionar um medicamento anti-câncer adequado para o tratamento de um câncer, o método compreendendo:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio aqui descrito; e

(d) determinar se o medicamento anti-câncer é adequado ou inadequado para o tratamento do câncer, comparando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência gerado na ausência do medicamento anti-câncer.

Em uma modalidade preferida, o método para selecionar um medicamento anti-câncer adequado para o tratamento de um câncer compreende:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato

---

celular usando um ensaio compreendendo uma diluição em série de anticorpos de captura específicos para a proteína de fusão oncogênica, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido;

(d) comparar o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência gerado na ausência do medicamento anti-câncer; e

(e) indicar se o medicamento anti-câncer é adequado para o tratamento do câncer quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica for alterado (por exemplo, substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão e/ou ativação de referência.

Em certos exemplos, a modalidade preferida pode compreender adicionalmente, isto é, como etapa (f), ou compreender alternativamente, isto é, como etapa (e), a etapa de indicar se o medicamento anti-câncer é inadequado para o tratamento do câncer quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica não for alterado (por exemplo, não for substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão e/ou ativação de referência. Em outros exemplos, uma ou mais moléculas de transdução de sinal presentes no extrato celular são detectadas, além de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, e o medicamento anti-câncer é determinado para ser adequado ou inadequado com base neste "perfil molecular".

Em modalidades particulares, tanto os níveis de proteína de fusão oncogênica total quanto ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, BCR-ABL) são medidos no extrato celular, de acordo com os ensaios a base de anticorpo da presente invenção, e uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) pode ser calculada e usada para determinar se o medicamento anti-câncer é adequado ou inadequado para o tratamento do

---

câncer, por exemplo, comparando a razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica fosfo/total com uma mesma razão calculada com base nos perfis de expressão e ativação de referência, que foram gerados na ausência do medicamento anti-câncer.

5                   Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para identificar a resposta de um câncer ao tratamento com um medicamento anti-câncer, o método compreendendo:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-  
10   câncer;

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio aqui descrito; e

15                   (d) identificar o câncer como responsivo ou não responsivo ao tratamento com o medicamento anti-câncer, comparando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência gerado na ausência do medicamento anti-câncer.

20                   Em uma modalidade preferida, o método para identificar a resposta de um câncer ao tratamento com um medicamento anti-câncer compreende:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-  
25   câncer;

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio que compreende uma diluição em série de

---

anticorpos de captura específicos para a proteína de fusão oncogênica, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido;

(d) comparar o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência gerado na ausência do medicamento anti-câncer; e

(e) indicar se o câncer é responsivo ao tratamento com o medicamento anti-câncer quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica for alterado (por exemplo, substancialmente diminuído), comparado com o perfil de expressão e/ou ativação de referência.

Em certos exemplos, a modalidade preferida pode compreender adicionalmente, isto é, como etapa (f), ou compreender alternativamente, isto é, como etapa (e), a etapa de indicar se o câncer é não responsivo ao tratamento com o medicamento anti-câncer quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica não for alterado (por exemplo, não for substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão e/ou ativação de referência. Em outros exemplos, uma ou mais moléculas de transdução de sinal presentes no extrato celular são detectadas, além de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, e o câncer é identificado como responsivo ou não responsivo ao tratamento com base neste "perfil molecular".

Em modalidades particulares, tanto os níveis de proteína de fusão oncogênica total quanto ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, BCR-ABL) são medidos no extrato celular, de acordo com os ensaios a base de anticorpo da presente invenção, e uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) pode ser calculada e usada para identificar se o câncer é responsivo ou não responsivo ao tratamento com o medicamento anti-câncer, por exemplo, comparando a razão dos níveis de proteína de fusão

---

oncogênica fosfo/total com uma mesma razão calculada com base nos perfis de expressão e ativação de referência, que foram gerados na ausência do medicamento anti-câncer.

5 Ainda em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para prever a resposta de um sujeito com câncer ao tratamento com um medicamento anti-câncer, o método compreendendo:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

10 (b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio aqui descrito; e

(d) prever a probabilidade com a qual o sujeito responderá ao  
15 tratamento com o medicamento anti-câncer, comparando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência, gerado na ausência do medicamento anti-câncer.

20 Em uma modalidade preferida, o método para prever a resposta de um sujeito com câncer ao tratamento com um medicamento anti-câncer compreende:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

25 (b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio compreendendo uma diluição em série de

---

anticorpos de captura específicos para a proteína de fusão oncogênica, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido;

(d) comparar o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência, gerado na ausência do medicamento anti-câncer; e

(e) indicar se o sujeito provavelmente responderá ao tratamento com o medicamento anti-câncer quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica for alterado (por exemplo, substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão e/ou ativação de referência.

Em certos exemplos, a modalidade preferida pode compreender adicionalmente, isto é, como etapa (f), ou compreender alternativamente, isto é, como etapa (e), a etapa de indicar se o sujeito provavelmente não responderá ao tratamento com o medicamento anti-câncer, quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica não for alterado (por exemplo, não for substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão e/ou ativação de referência. Em outros exemplos, uma ou mais moléculas de transdução de sinal presentes no extrato celular são detectadas, além de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, e a probabilidade de que o sujeito responderá ao tratamento é prevista com base neste "perfil molecular".

Em modalidades particulares, tanto os níveis de proteína de fusão oncogênica total quanto ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, BCR-ABL) são medidos no extrato celular, de acordo com os ensaios a base de anticorpo da presente invenção, e uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) pode ser calculada e usada para prever se o sujeito apresentará uma probabilidade de responder ao tratamento com o medicamento anti-câncer, por exemplo, comparando a razão dos níveis de

---

proteína de fusão oncogênica fosfo/total com uma mesma razão calculada com base nos perfis de expressão e ativação de referência, que foram gerados na ausência do medicamento anti-câncer.

Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece um  
5 método para determinar se um sujeito com câncer é resistente ao tratamento com um medicamento anti-câncer, o método compreendendo:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

10 (b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio aqui descrito; e

(d) determinar se o sujeito é resistente ou sensível ao  
15 tratamento com o medicamento anti-câncer, comparando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência, gerado na ausência do medicamento anti-câncer ou na presença do medicamento anti-câncer em um estágio inicial.

Em uma modalidade preferida, o método para determinar se  
20 um sujeito com câncer é resistente ao tratamento com um medicamento anti-câncer compreende:

(a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;

25 (b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) determinar um nível de expressão e/ou ativação (por exemplo, fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, usando um ensaio compreendendo uma diluição em série de

---

anticorpos de captura específicos para a proteína de fusão oncogênica, em que os anticorpos de captura são limitados em um suporte sólido;

(d) comparar o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um perfil de expressão e/ou ativação de referência, gerado na ausência do medicamento anti-câncer ou na presença do medicamento anti-câncer em um estágio inicial; e

(e) indicar se o sujeito é resistente ao tratamento com o medicamento anti-câncer quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica não for alterado (por exemplo, não for substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão e/ou ativação de referência.

Em certos exemplos, a modalidade preferida pode compreender adicionalmente, isto é, como etapa (f), ou compreender alternativamente, isto é, como etapa (e), a etapa de indicar se o sujeito é sensível ao tratamento com o medicamento anti-câncer quando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica for alterado (por exemplo, substancialmente diminuído), comparado ao perfil de expressão e/ou ativação de referência. Em outros exemplos, uma ou mais moléculas de transdução de sinal presentes no extrato celular são detectadas, além de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas, e o sujeito é identificado como resistente ou sensível ao tratamento com base neste "perfil molecular".

Em modalidades particulares, tanto os níveis de proteína de fusão oncogênica total quanto ativada (por exemplo, fosforilada) (por exemplo, BCR-ABL) são medidos no extrato celular, de acordo com os ensaios a base de anticorpo da presente invenção, e uma razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica ativada para total (por exemplo, razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total) pode ser calculada e usada para determinar se o sujeito é resistente ou sensível ao tratamento com o medicamento anti-

---

câncer, por exemplo, comparando a razão dos níveis de proteína de fusão oncogênica fosfo/total com uma mesma razão calculada com base nos perfis de expressão e ativação de referência, que foram gerados na ausência do medicamento anti-câncer ou na presença do medicamento anti-câncer em um estágio inicial.

Em algumas modalidades, os métodos da presente invenção pode compreender adicionalmente enviar ou relatar os resultados da etapa (d) para um médico, por exemplo, um oncologista ou um clínico geral. Em outras modalidades, os métodos da presente invenção podem compreender adicionalmente registrar ou armazenar os resultados da etapa (d) em uma base de dados de computador ou outra máquina ou dispositivo adequado para armazenar informação, por exemplo, em um laboratório.

Em algumas modalidades, os métodos da presente invenção podem compreender adicionalmente a etapa de obter uma amostra de um sujeito com câncer, a partir do qual as células, tais como células de câncer, são isoladas. A amostra pode ser obtida de um sujeito tanto antes do tratamento com medicamento anti-câncer (por exemplo, antes da incubação com um medicamento anti-câncer) quanto após a administração de um medicamento anti-câncer (por exemplo, em qualquer período durante todo o tratamento de câncer). As amostras adequadas incluem, mas sem limitação, sangue total, plasma, soro, fluido do lavado ductal, aspirado de mama, linfa (por exemplo, células tumorais disseminadas do linfonodo), aspirado de medula óssea, saliva, urina, excremento (isto é, fezes), escarro, fluido do lavado brônquico, lágrimas, aspirado por agulha fina (por exemplo, coletado por aspiração por agulha fina periareolar aleatória), qualquer outro fluido corporal, uma amostra tecidual (por exemplo, tecido tumoral), tal como uma biópsia de um tumor (por exemplo, biópsia por agulha) ou um linfonodo (por exemplo, biópsia de linfonodo sentinela), e extratos celulares destes. Em algumas modalidades, a amostra é sangue total ou um componente fracional

deste, tal como plasma, soro, células vermelhas do sangue, leucócitos tais como células mononucleares do sangue periférico, e/ou células raras circulantes. Em modalidades particulares, a amostra é obtida isolando os leucócitos ou células circulantes de um tumor sólido a partir do sangue total, ou uma fração celular deste, usando qualquer técnica conhecida na tecnologia. Se as células isoladas forem obtidas de um sujeito que não recebeu tratamento com um medicamento anti-câncer, as células isoladas podem ser incubadas *in vitro*, em condições adequadas, com um ou um coquetel de medicamentos anti-câncer que alvejam um ou mais dos analitos a serem detectados na etapa (c).

Em certas modalidades, o câncer é uma malignidade hematológica (por exemplo, leucemia, linfoma), sarcoma osteogênico (por exemplo, sarcoma de Ewing), sarcoma de tecido mole (por exemplo, DFSP, rabdomiossarcoma), outra malignidade de tecido mole, carcinoma de tireóide papilar, ou câncer de próstata. Em modalidades particulares, o câncer é causado pela formação de uma proteína de fusão oncogênica em virtude de uma translocação cromossômica nas células cancerosas ou tumor.

Em algumas modalidades, as células isoladas são estimuladas *in vitro* com fatores de crescimento da maneira aqui descrita. Em outras modalidades, o medicamento anti-câncer pode compreender um ou mais dos agentes terapêuticos aqui descritos incluindo, mas sem limitação, anticorpos monoclonais, inibidores de tirosina quinase, agentes quimioterapêuticos, agentes terapêuticos hormonais, agentes radioterapêuticos e vacinas.

Em algumas modalidades, o estado de ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica presente no extrato celular pode ser, por exemplo, um estado de fosforilação, um estado de ubiquitinação, um estado de complexação, ou combinações dos mesmos. Em outras modalidades, o suporte sólido pode compreender, por exemplo, vidro, plástico, chipes, pinos, filtros, contas, papel, membrana, feixes de fibras e combinações dos mesmos.

---

Ainda em outras modalidades, os anticorpos de captura são limitados no suporte sólido em um arranjo direcionável.

Em certas modalidades, o ensaio na etapa (c) compreende:

(i) incubar (por exemplo, colocar em contato) o extrato celular com a diluição em série de anticorpos de captura para formar uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas capturadas (por exemplo, para transformar as proteínas de fusão oncogênicas, presentes no extrato celular, em complexos de proteínas de fusão oncogênicas capturadas compreendendo as proteínas de fusão oncogênicas e anticorpos de captura);

(ii) incubar (por exemplo, colocar em contato) a pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas capturadas com anticorpos de detecção, que compreendem os anticorpos independentes do estado de ativação e anticorpos dependentes do estado de ativação específico para o mesmo ou diferente domínio da proteína de fusão oncogênica, para formar uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas capturadas detectáveis (por exemplo, para transformar os complexos de proteínas de fusão oncogênicas capturadas em complexos de proteínas de fusão oncogênicas capturadas detectáveis compreendendo as proteínas de fusão oncogênicas capturadas e anticorpos de detecção),

em que os anticorpos independentes do estado de ativação são marcados com uma fração de facilitação, os anticorpos dependentes do estado de ativação são marcados com um primeiro elemento de um par de amplificação de sinal, e a fração de facilitação gera um agente de oxidação que canaliza e reage com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal;

(iii) incubar (por exemplo, colocar em contato) a pluralidade de analitos capturados detectáveis com um segundo elemento do par de amplificação de sinal para gerar um sinal amplificado, e

---

(iv) detectar o sinal amplificado gerado a partir do primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal.

Os anticorpos independentes do estado de ativação podem ser marcados diretamente com a fração de facilitação ou marcados indiretamente com a fração de facilitação, por exemplo, por meio de hibridização entre um oligonucleotídeo conjugado com os anticorpos independentes do estado de ativação e um oligonucleotídeo complementar conjugado na fração de facilitação. De maneira similar, os anticorpos dependentes do estado de ativação podem ser marcados diretamente com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal ou marcados indiretamente com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal, por exemplo, por meio de ligação entre um primeiro elemento de um par de ligação conjugado com os anticorpos dependentes do estado de ativação e um segundo elemento do par de ligação conjugado com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal. Em certos exemplos, o primeiro elemento do par de ligação é biotina, e o segundo elemento do par de ligação é um avidina, tal como estreptavidina ou neutravidina.

Em algumas modalidades, a fração de facilitação pode ser, por exemplo, glicose oxidase (GO). Em certos exemplos, a GO e os anticorpos independentes do estado de ativação podem ser conjugados com uma molécula de dextrano ativada com sulfidril. A molécula de dextrano ativada com sulfidril apresenta tipicamente um peso molecular de cerca de 500kDa (por exemplo, cerca de 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, ou 750kDa). Em outras modalidades, o agente de oxidação pode ser, por exemplo, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Ainda em outras modalidades, o primeiro elemento do par de amplificação de sinal pode ser, por exemplo, uma peroxidase tal como peroxidase de rábano silvestre (HRP). Em modalidades adicionais, o segundo elemento do par de amplificação de sinal pode ser, por exemplo, um reagente tiramida (por exemplo, biotina-tiramida).

---

Preferivelmente, o sinal amplificado é gerado por oxidação de peroxidase de biotina-tiramida para produzir uma tiramida ativada (por exemplo, para transformar a biotina-tiramida em uma tiramida ativada). A tiramida ativada pode ser detectada diretamente ou detectada indiretamente, por exemplo, com a adição de um reagente de detecção de sinal. Os exemplos não limitantes de reagentes de detecção de sinal incluem fluoróforo marcado com estreptavidinas, e combinações de peroxidases marcadas com estreptavidina e reagentes cromogênicos tal como, por exemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

Em certos exemplos, a HRP e os anticorpos dependentes do estado de ativação podem ser conjugados com uma molécula de dextrano ativada com sulfidril. A molécula de dextrano ativada com sulfidril apresenta tipicamente um peso molecular de cerca de 70kDa (por exemplo, cerca de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, ou 100kDa).

## **VI. Produção de anticorpos**

A geração e seleção de anticorpos ainda não disponíveis comercialmente para analisar os estados de ativação de proteínas de fusão oncogênicas, ou moléculas de transdução de sinal, em uma amostra biológica tal como um extrato ou lisado celular, de acordo com a invenção, podem ser realizadas de várias maneiras. Por exemplo, uma delas é expressar e/ou purificar um polipeptídeo de interesse (isto é, antígeno) usando os métodos de expressão e purificação de proteína conhecidos na técnica, enquanto uma outra maneira é sintetizar o polipeptídeo de interesse usando métodos de síntese de peptídeo de fase sólida conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol., Vol. 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields, ed., Meth. Enzymol., Vol. 289 (1997); Kiso et al., Chem. Pharm. Bull., 38: 1192-99 (1990); Mostafavi et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1:255-60, (1995); e Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull., 44: 1326-31 (1996). O

polipeptídeo purificado ou sintetizado pode então ser injetado, por exemplo, em camundongos ou coelhos, para gerar anticorpos policlonais ou monoclonais. Os versados na técnica reconhecerão que muitos procedimentos são disponíveis para a produção de anticorpos, por exemplo, da maneira descrita em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Harlow e Lane, Eds., Cold Spring Harbor Laboratório, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). Os versados na técnica também entenderão que os fragmentos de ligação ou fragmentos Fab, que mimetizam (por exemplo, mantêm as regiões de ligação funcional de) anticorpos, também podem ser preparados a partir da informação genética por vários procedimentos. Ver, por exemplo, *Antibody Engineering: A Practical Approach*, Borrebaeck, Ed., Oxford University Press, Oxford (1995); e Huse et al., *J. Immunol*, 149:3914-3920 (1992).

Além disso, várias publicações relataram o uso de tecnologia de exibição de fago para produzir e selecionar bibliotecas de polipeptídeos para se ligar a um antígeno alvo selecionado (ver, por exemplo, Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378-6382 (1990); Devlin et al., *Science*, 249:404-406 (1990); Scott et al., *Science*, 249:386-388 (1990); e Ladner et al., patente U.S. 5.571.698). Um conceito básico de métodos de exibição de fago é o estabelecimento de uma associação física entre um polipeptídeo codificado por um DNA de fago e um antígeno alvo. Esta associação física é fornecida pela partícula do fago, que exibe um polipeptídeo como parte de um capsídeo que engloba o genoma do fago, que codifica o polipeptídeo. O estabelecimento de uma associação física entre os polipeptídeos e seu material genético permite a seleção de massa simultânea de um número muito alto de fagos que carregam diferentes polipeptídeos. O fago que exibe um polipeptídeo com afinidade para um antígeno alvo se liga ao antígeno alvo, e estes fagos são enriquecidos por seleção de afinidade com o antígeno alvo. A identidade dos polipeptídeos exibidos a partir destes fagos pode ser determinada a partir de seus respectivos genomas. Usando estes métodos, um

polipeptídeo identificado como tendo uma afinidade de ligação com um antígeno alvo desejado pode então ser sintetizado em massa por meios convencionais (ver, por exemplo, patente U.S. 6.057.098).

Os anticorpos que são gerados por estes métodos podem então ser selecionados separando primeiro por afinidade e especificidade com o antígeno de polipeptídeo de interesse purificado e, se exigido, comparando os resultados da afinidade e especificidade dos anticorpos com outros antígenos de polipeptídeo que deseja-se que sejam excluídos da ligação. O procedimento de separação pode envolver a imobilização dos antígenos de polipeptídeo purificado em poços separados das placas de microtitulação. A solução que contém um anticorpo potencial, ou grupo de anticorpos, é então colocada nos respectivos poços de microtitulação e incubada por cerca de 30 minutos a 2 horas. Os poços de microtitulação são então lavados e um anticorpo secundário marcado (por exemplo, um anticorpo anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina, se os anticorpos aumentados forem anticorpos de camundongo) é adicionado aos poços e incubado por cerca de 30 minutos e então lavado. O substrato é adicionado aos poços e uma reação colorida aparecerá onde o anticorpo para o antígeno de polipeptídeo imobilizado estiver presente.

Os anticorpos assim identificados podem ser então analisados adicionalmente por afinidade e especificidade. No desenvolvimento de imunoensaios para uma proteína alvo, a proteína alvo purificada age como um padrão que mede a sensibilidade e especificidade do imunoensaio usando os anticorpos que foram selecionados. Em decorrência da afinidade de ligação de vários anticorpos poder diferir, por exemplo, certas combinações de anticorpo podem interferir uma com a outra estericamente, o desempenho do ensaio de um anticorpo pode ser uma medida mais importante que a afinidade e especificidade absolutas daquele anticorpo.

---

Os versados na técnica entenderão que muitas abordagens podem ser obtidas na produção de anticorpos ou fragmentos de ligação, e na separação e seleção por afinidade e especificidade com vários polipeptídeos de interesse, mas estas abordagens não mudam o escopo da presente invenção.

### A. Anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais são preferivelmente aumentados em animais por injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) múltiplas de um polipeptídeo de interesse e um adjuvante. Podem ser usados para conjugar o polipeptídeo de interesse em uma proteína carreadora, que é imunogênica na espécie a ser imunizadas tais como, por exemplo, hemocianina de lapa californiana, albumina sérica, tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja, usando um agente bifuncional ou de derivação. Os exemplos não limitantes de agentes bifuncionais ou de derivação incluem éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugação por meio de resíduos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (conjugação por meio de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidreto succínico,  $\text{SOCl}_2$ , e  $\text{R}_1\text{N}-\text{C}=\text{NR}$ , em que R e  $\text{R}_1$  são diferentes grupos alquila.

Os animais são imunizados contra o polipeptídeo de interesse ou um conjugado imunogênico, ou derivado deste, combinando, por exemplo, 100  $\mu\text{g}$  (para coelhos) ou 5  $\mu\text{g}$  (para camundongos) do antígeno, ou conjugado com 3 volumes de adjuvante completo de Freund, e injetando a solução intradermicamente em múltiplos sítios. Após um mês, os animais são estimulados com cerca de 1/5 a 1/10 da quantidade original de polipeptídeo, ou conjugado em adjuvante incompleto de Freund, por injeção subcutânea em múltiplos sítios. Sete a quatorze dias após, os animais são sangrados e o soro é ensaiado para titulação de anticorpo. Os animais são estimulados de maneira típica até a titulação atingir um platô. Preferivelmente, o animal é estimulado com o conjugado do mesmo polipeptídeo, mas a conjugação com uma

---

proteína imunogênica diferente e/ou por meio de um reagente de reticulação diferente pode ser usada. Os conjugados também podem ser preparados em cultura de célula recombinante como proteínas de fusão. Em certos exemplos, os agentes de agregação, tal como alumínio, podem ser usados para melhorar a resposta imune.

### **B. Anticorpos monoclonais**

Os anticorpos monoclonais são obtidos em geral a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idêntico, exceto para as possíveis mutações de ocorrência natural que pode estar presente em quantidades menores. Assim, o modificador "monoclonal" indica a característica do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos discretos. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser preparados usando o método de hibridoma descrito por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), ou por qualquer método de DNA recombinante conhecido na técnica (ver, por exemplo, patente U.S. 4.816.567).

No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado (por exemplo, hamster) é imunizado, da maneira descrita anteriormente, para eliciar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligam especificamente ao polipeptídeo de interesse usado para imunização. Alternativamente, os linfócitos são imunizados *in vitro*. Os linfócitos imunizados são então fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar células de hibridoma (ver, por exemplo, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp. 59-103 (1986)). As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e crescidas em um meio de cultura adequado que contém preferivelmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Por exemplo, se as células parentais de mieloma não apresentam a

---

enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT), o meio de cultura para as células de hibridoma incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), que previnem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

5                   As células de mieloma preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, suportam a produção estável e em nível elevado de anticorpo pelas células produtoras do anticorpo selecionado, e/ou são sensíveis a um meio, tal como o meio HAT. Exemplos de tais linhagens celulares de mieloma preferidas para a produção de anticorpos monoclonais humanos  
10 incluem, mas sem limitação, linhagens de mieloma de murino tais como aquelas derivadas de células de tumores de camundongo MOPC-21 e MPC-11 (disponíveis pela Salk Institute Cell Distribution Center; San Diego, CA), SP-2 ou X63-Ag8-653 (disponíveis pela American Type Culture Collection; Rockville, MD), e linhagens celulares de mieloma de humano ou  
15 heteromieloma de camundongo-humano (ver, por exemplo, Kozbor, J. Immunol, 133:3001 (1984); e Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, pp. 51-63 (1987)).

20                   O meio de cultura no qual as células de hibridoma são crescidas pode ser ensaiado para a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o polipeptídeo de interesse. Preferivelmente, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como um radioimunoensaio (RIA) ou ensaio  
25 imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA). A afinidade de ligação de anticorpos monoclonais pode ser determinada usando, por exemplo, a análise de Scatchard de Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Após a identificação das células de hibridoma que produzem anticorpos de especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones

---

podem ser subclonados limitando os procedimentos de diluição e crescidos por métodos padrões (ver, por exemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp. 59-103 (1986)). Os meios de cultura adequados para este propósito incluem, por exemplo, o meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser crescidas *in vivo* como ascite tumoral em um animal. Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones podem ser separados do meio de cultura, fluido de ascite ou soro, por procedimentos convencionais de purificação de anticorpos tais como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia por afinidade.

O DNA que codifica os anticorpos monoclonais pode ser isolado e sequenciado facilmente usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligar especificamente aos genes que codificam as cadeias pesadas e leves dos anticorpos de murino). As células de hibridoma funcionam como uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são então transfectados em células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que não produzem de outra o anticorpo, para induzir a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Ver, por exemplo, Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993); e Pluckthun, *Immunol Rev.*, 130:151-188 (1992). O DNA também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência codificante para domínios constantes de cadeia pesada e leve de humano no lugar das sequências homólogas de murino (ver, por exemplo, a patente U.S. 4.816.567; e Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), ou unindo covalentemente na sequência codificante de imunoglobulina toda ou parte da sequência codificante para um peptídeo não imunoglobulina.

---

Em uma modalidade adicional, os anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpo podem ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpo para expressão em fago, geradas usando as técnicas descritas em, por exemplo, McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990); Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); e Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). A produção de anticorpos monoclonais humanos de alta afinidade (faixa nM) por embaralhamento de cadeias é descrita em Marks et al., *BioTechnology*, 10:779-783 (1992). O uso de infecção combinatorial e recombinação *in vivo* como uma estratégia para construir bibliotecas de fago muito grandes é descrito em Waterhouse et al., *Nuc. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993). Assim, estas técnicas são alternativas viáveis nos métodos de hibridoma em anticorpo monoclonal tradicional para a geração de anticorpos monoclonais.

### C. Anticorpos humanizados

Os métodos para humanizar anticorpos não humanos são conhecidos na técnica. Preferivelmente, um anticorpo humanizado apresenta um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos a partir de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácido não humano são frequentemente referidos como resíduos de "importação", que são obtidos tipicamente de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser realizada substituindo essencialmente as sequências da região hipervariável de um anticorpo não humano pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Ver, por exemplo, Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); e Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988). Dessa maneira, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (ver, por exemplo, patente U.S. 4.816.567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em

que alguns resíduos de região hipervariável, e possivelmente alguns resíduos de região de estrutura (FR), são substituídos por resíduos de sítios análogos de anticorpos de roedores.

A escolha de domínio variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, a serem usados no preparo de anticorpos humanizados aqui descrito é uma consideração importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o método assim denominado "mais adequado", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é selecionado contra toda a biblioteca de sequências de domínio variável humano conhecida. A sequência humana que é mais próxima àquela de roedor é então aceita como a FR humana para o anticorpo humanizado (ver, por exemplo, Sims et al., J. Immunol, 151:2296 (1993); e Chothia et al., J. M. Biol, 196:901 (1987)). Um outro método usa uma FR particular derivada da sequência consensual de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias pesadas e leves. A mesma FR pode ser usada para vários anticorpos humanizados diferentes (ver, por exemplo, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); e Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Também é importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade com o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, os anticorpos humanizados podem ser preparados por um processo de análise das sequências parentais e de vários produtos humanizados conceituais, usando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Os modelos de imunoglobulina tridimensional são comumente disponíveis e são familiares aos versados na técnica. Os programas de computador são que são disponíveis ilustram e exibem prováveis estruturas conformacionais tridimensionais de sequências de imunoglobulina candidata selecionada. A inspeção destas exhibições permite a análise do provável papel dos resíduos no funcionamento da ~~sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que~~

---

influencia a capacidade da imunoglobulina candidata se ligar a seu antígeno. Desta maneira, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências receptoras e de importação, de maneira tal que as características do anticorpo desejado, tal como maior afinidade com o(s) antígeno(s) alvo(s), sejam atingidas. Em geral, os resíduos da região hipervariável estão direta e especificamente envolvidos na influência da ligação ao antígeno.

Várias formas de anticorpos humanizados são contempladas de acordo com a presente invenção. Por exemplo, o anticorpo humanizado pode ser um fragmento de anticorpo, tal como um fragmento Fab. Alternativamente, o anticorpo humanizado pode ser um anticorpo intacto, tal como um anticorpo intacto IgA, IgG ou IgM.

#### **D. Anticorpos humanos**

Como uma alternativa para a humanização, os anticorpos humanos podem ser gerados. Em algumas modalidades, os animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que podem ser produzidos são capazes, mediante imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, descreveu-se que a deleção homozigota do gene da região de união de cadeia pesada do anticorpo (JH), em camundongos quiméricos e de linhagem germinal mutante, resulta na completa inibição da produção de anticorpo endógeno. A transferência do arranjo de gene de imunoglobulina da linhagem germinal humana em tais camundongos de linhagem germinal mutante resultará na produção de anticorpos humanos, mediante desafio com antígeno. Ver, por exemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immun., 7:33 (1993); e patentes U.S. 5.591.669, 5.589.369 e 5.545.807.

Alternativamente, a tecnologia de exibição de fago (ver, por exemplo, McCafferty et al., Nature, 348:552-553 (1990)) pode ser usada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpo *in vitro*, usando repertórios de gene do domínio variável (V) de imunoglobulina a partir de doadores não humanizados. De acordo com esta técnica, os genes do domínio V do anticorpo são clonados em alinhamento tanto em um maior quanto menor gene de proteína de revestimento de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd, e exibidos como fragmentos funcionais de anticorpo na superfície da partícula do fago. Em decorrência da partícula filamentosa conter uma cópia de DNA de fita simples do genoma do fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam em seleção do gene que codifica o anticorpo que exibe estas propriedades. Assim, o fago mimetiza algumas das propriedades da célula B. A exibição de fago pode ser realizada em uma variedade de formatos da maneira descrita, por exemplo, em Johnson et al., Curr. Opin. Struct. Biol, 3:564-571 (1993). Várias fontes de segmentos do gene V podem ser usadas para exibição de fago. Ver, por exemplo, Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). Um repertório de genes V de doadores humanos não humanizados pode ser construído e os anticorpos em um arranjo diverso de antígenos (incluindo auto-antígenos) podem ser isolados seguindo essencialmente as técnicas descritas em Marks et al., J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991); Griffith et al., EMBO J., 12:725-734 (1993) e patentes U.S. 5.565.332 e 5.573.905.

Em certos exemplos, os anticorpos humanos podem ser gerados por células B ativadas *in vitro* da maneira descrita em, por exemplo, patentes U.S. 5.567.610 e 5.229.275.

### **E. Fragmentos de anticorpo**

Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados por meio de digestão proteolítica de anticorpo intactos (ver, por exemplo,

---

Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Meth., 24: 107-117 (1992); e Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Entretanto, estes fragmentos podem ser agora produzidos diretamente usando células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpo podem ser isolados das bibliotecas de anticorpo para exibição em fago discutidas anteriormente. Alternativamente, os fragmentos Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de células de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (ver, por exemplo, Carter et al., BioTechnology, 10:163-167 (1992)). De acordo com uma outra abordagem, os fragmentos F(ab')<sub>2</sub> podem ser isolados diretamente a partir de cultura de célula hospedeira humana. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes aos versados na técnica. Em outras modalidades, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia simples (Fvsc). Ver, por exemplo, a publicação PCT WO 93/16185 e as patentes U.S. 5.571.894 e 5.587.458. O fragmento de anticorpo também pode ser um anticorpo linear da maneira descrita, por exemplo, na patente U.S. 5.641.870. Tais fragmentos de anticorpo linear podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

#### **F. Anticorpos biespecíficos**

Os anticorpos biespecíficos são os anticorpos que apresentam especificidades de ligação com pelo menos dois epítomos diferentes. Os anticorpos biespecíficos exemplares podem se ligar a dois epítomos diferentes do mesmo polipeptídeo de interesse. Outros anticorpos biespecíficos podem combinar um sítio de ligação com o polipeptídeo de interesse com sítio(s) de ligação(s) para um ou mais antígenos adicionais. Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de tamanho completo ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, F(ab')<sub>2</sub> de anticorpos biespecíficos).

Os métodos para preparar anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. A produção tradicional de anticorpos de tamanho

---

completo biespecíficos baseia-se na co-expressão de dois pares de cadeia pesada e cadeia leve de imunoglobulina, onde as duas cadeias apresentam diferentes especificidades (ver, por exemplo, Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Em decorrência da variedade aleatória de cadeias pesadas e leves  
5 de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas diferentes de anticorpo, das quais apenas uma apresenta a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta é realizada em geral por cromatografia por afinidade. Os procedimentos similares são revelados na publicação PCT WO 93/08829 e Traunecker et al.,  
10 *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente, os domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação anticorpo-antígeno) são fundidos nas sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão é preferivelmente com um domínio  
15 constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões de dobradiça, CH2 e CH3. É preferível apresentar a primeira região constante de cadeia pesada (CHI), que contém o sítio necessário pra ligação de cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. O DNA que codifica as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia  
20 leve de imunoglobulina, é inserido em vetores de expressão separados, e são co-transfectados em um organismo hospedeiro adequado. Isto fornece melhor flexibilidade no ajuste das proporções mutuais dos três fragmentos de polipeptídeo, em modalidades quando razões desiguais das três cadeias de polipeptídeo usadas na construção fornecem os rendimentos ideais.  
25 Entretanto, é possível inserir as sequências codificantes para duas ou todas as três cadeias de polipeptídeo em um vetor de expressão, quando a expressão de pelo menos duas cadeias de polipeptídeo em razões iguais resulta em altos rendimentos, ou quando as razões não apresentam nenhum significado particular.

---

Em uma modalidade preferida desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação em um braço, e um par de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina híbrida (que fornece uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Esta estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado a partir de combinações de cadeia de imunoglobulina não desejada, uma vez que a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas metade da molécula biespecífica fornece uma maneira fácil de separação. Ver, por exemplo, publicação PCT WO 94/04690 e Suresh et al., *Meth. Enzymol.*, 121:210 (1986).

De acordo com uma outra abordagem descrita na patente U.S. 5.731.168, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser modificada geneticamente para maximizar o percentual de heterodímeros que são recuperados a partir de cultura de célula recombinante. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio CH3 de um domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais pequenas de aminoácido da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas com maiores cadeias laterais (por exemplo, tirosina ou triptofano). As "cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia lateral(s) grande(s) são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo substituindo grandes cadeias laterais de aminoácido por outras menores (por exemplo, alanina ou treonina). Isto fornece um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero, com relação a produtos finais indesejados, tais como homodímeros.

Os anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado à avidina, e o outro à biotina. Os anticorpos heteroconjugados podem ser preparados usando qualquer método de ~~reticulação conveniente~~. Os agentes de reticulação e técnicas adequados são

---

bem conhecidos na tecnologia e são revelados, por exemplo, na patente U.S. 4.676.980.

As técnicas adequadas para gerar anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpo são também conhecidas na tecnologia. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos podem ser preparados usando ligação química. Em certos exemplos, os anticorpos biespecíficos podem ser gerados por um procedimento no qual os anticorpo intactos são clivados proteoliticamente para gerar fragmentos  $F(ab')_2$  (ver, por exemplo, Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente de complexação ditiol, arsenito de sódio, para estabilizar os ditióis vicinais e prevenir a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab'-TNB é então reconvertido em Fab'-tiol por redução com mercaptoetilamina, e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado de Fab'-TNB para formar o anticorpo biespecífico.

Em algumas modalidades, os fragmentos Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Por exemplo, uma molécula de  $F(ab')_2$  do anticorpo biespecífico completamente humanizado pode ser produzida pelos métodos descritos em Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992). Cada fragmento Fab' foi secretado separadamente a partir de *E. coli* e submetido ao acoplamento químico direcionado *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico.

Várias técnicas para preparar e isolar fragmentos de anticorpo biespecífico diretamente de cultura de células recombinantes também foram descritas. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos foram produzidos usando zíperes de leucina. Ver, por exemplo, Kostelny et al., J. Immunol., 148: 1547-1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes por fusão de gene. Os

---

homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região de dobradiça para formar monômeros, e então re-oxidados para formar os heterodímeros do anticorpo. Este método também pode ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia de "diacorpo", descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), forneceu um mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticorpo biespecífico. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) por um ligante, que é muito pequeno para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Dessa maneira, os domínios VH e VL de um fragmento são forçados a parear com os domínios complementares VL e VH de um outro fragmento, formando por meio disso dois sítios de ligação de antígeno. Uma outra estratégia para preparar fragmentos de anticorpo biespecífico pelo uso de dímeros de Fv de cadeia leve (Fvs) é descrita em Gruber et al., J. Immunol, 152:5368 (1994).

Os anticorpos com mais de duas valências também são contemplados. Por exemplo, os anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Ver, por exemplo, Tutt et al., J. Immunol, 147:60 (1991).

### **G. Purificação de anticorpo**

Durante o uso de técnicas recombinantes, os anticorpos podem ser produzidos dentro de uma célula hospedeira isolada, no espaço periplasmático de uma célula hospedeira, ou secretados diretamente de uma célula hospedeira no meio. Se o anticorpo for produzido intracelularmente, os resíduos de partícula são removidos primeiro, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Carter et al., BioTech., 10: 163-167 (1992) descrevem um procedimento para isolar os anticorpos que são secretados no espaço periplasmático de *E. coli*. Resumidamente, a pasta celular é descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSE) por cerca de 30 minutos. Os restos celulares podem ser removidos

---

por centrifugação. Onde o anticorpo é secretado no meio, os sobrenadantes de cada sistema de expressão são concentrados usando em geral um filtro de concentração de proteína disponível comercialmente, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease, tal como PMSF, pode ser incluído em qualquer das etapas anteriores para inibir a proteólise, e os antibióticos podem ser incluídos para prevenir o crescimento de contaminantes imprevistos.

A composição de anticorpo preparada a partir de células pode ser purificada usando, por exemplo, cromatografia por hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise e cromatografia por afinidade. A adequabilidade da proteína A como um ligante de afinidade depende da espécie e do isotipo de qualquer domínio Fc de imunoglobulina, que está presente no anticorpo. A proteína A pode ser usada para purificar anticorpos que baseiam-se em cadeias pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  ou  $\gamma 4$  de humano (ver, por exemplo, Lindmark et al., J. Immunol. Meth., 62:1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isotipos de camundongo e para  $\gamma 3$  de humano (ver, por exemplo, Guss et al., EMBO J, 5:1567-1575 (1986)). A matriz na qual o ligante de afinidade é afixado é mais frequentemente agarose, mas outras matrizes são disponíveis. As matrizes mecanicamente estáveis, tais como as de vidro com poro controlado ou poli(estirenodivinil)benzeno, permitem vazões mais rápidas e tempos de processamento mais curtos do que pode ser atingido com agarose. Onde o anticorpo compreende um domínio CH3, a resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker; Phillipsburg, N. J.) é usada para purificação. Outras técnicas para a purificação de proteína, tais como fracionamento em uma coluna de troca iônica, precipitação de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina SEPHAROSE™, cromatografia em uma resina de troca aniônica ou catiônica (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), focagem isoeletrica, SDS-PAGE, e precipitação de sulfato de amônio também são disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado.

Após qualquer etapa(s) de purificação preliminar, a mistura compreendendo o anticorpo e contaminantes de interesse pode ser submetida a cromatografia de interação hidrofóbica em pH baixo, usando um tampão de eluição em um pH entre cerca de 2,5-4,5, preferivelmente realizadas baixas concentrações de sal (por exemplo, de cerca de 0-0,25 M de sal).

Os versados na técnica entenderão que qualquer molécula de ligação com uma função similar a um anticorpo, por exemplo, uma molécula de ligação ou parceiro de ligação que é específico para um ou mais analitos de interesse em uma amostra, também pode ser usada nos métodos e composições da presente invenção. Exemplos de moléculas do tipo anticorpo adequadas incluem, mas sem limitação, anticorpos de domínios, anticorpos de estrutura única, nanocorpos, proteínas reativas a antígeno de tubarão, avímeros, adnectinas, anti-calmantes, ligantes de afinidade, estruturas do tipo *Phylomers*, aptâmeros, Affibodies, trinectins e similares.

## VII. Métodos de administração

De acordo com os métodos da presente invenção, os medicamentos anti-câncer aqui descritos são administrados a um sujeito por qualquer meio conveniente conhecido na técnica. Os métodos da presente invenção podem ser usados para selecionar um medicamento anti-câncer adequado, ou combinação de medicamentos anti-câncer para o tratamento de um câncer (por exemplo, uma malignidade hematológica) em um sujeito. Os métodos da invenção também podem ser usados para identificar a resposta de um câncer (por exemplo, uma malignidade hematológica) em um sujeito para tratamento com um medicamento anti-câncer ou combinação de medicamentos anti-câncer. Além disso, os métodos da invenção podem ser usados para prever a resposta de um sujeito com câncer (por exemplo, uma malignidade hematológica) ao tratamento com um medicamento anti-câncer, ou combinação de medicamentos anti-câncer. Além do mais, os métodos da presente invenção podem ser usados para identificar um sujeito com câncer

---

(por exemplo, uma malignidade hematológica) que é resistente ao tratamento com um medicamento anti-câncer, ou combinação de medicamentos anti-câncer. Os versados na técnica entenderão que os medicamentos anti-câncer aqui descritos podem ser administrados sozinhos ou como parte de uma  
 5 abordagem terapêutica combinada com quimioterapia convencional, radioterapia, terapia hormonal, imunoterapia e/ou cirurgia.

Em certas modalidades, o medicamento anti-câncer compreende um agente anti-sinalização (isto é, um medicamento citostático), tal como um anticorpo monoclonal ou um inibidor de tirosina quinase, um  
 10 agente anti-proliferativo, um agente quimioterapêutico (isto é, um medicamento citotóxico), um agente terapêutico hormonal, um agente radioterapêutico, uma vacina e/ou qualquer outro composto com a capacidade de reduzir ou anular o crescimento descontrolado de células anormais, tais como células cancerosas. Em algumas modalidades, o sujeito é tratado com  
 15 um ou mais agentes anti-sinalização, agente anti-proliferativos e/ou agentes terapêuticos hormonais em combinação com pelo menos um agente quimioterapêutico. Os anticorpos monoclonais exemplares, inibidores de tirosina quinase, agentes anti-proliferativos, agentes quimioterapêuticos, agentes terapêuticos hormonais, agentes radioterapêuticos e vacinas são  
 20 descritos anteriormente.

Em algumas modalidades, os medicamentos anti-câncer aqui descritos podem ser co-administrados com agentes imunoterapêuticos convencionais incluindo, mas sem limitação, imunoestimulantes (por exemplo, bacilo de Calmette-Guerin (BCG), levamisol, interleucina-2, alfa-  
 25 interferon, etc.), imunotoxinas (por exemplo, conjugado de anticorpo monoclonal anti-CD33-caliqueamicina, conjugado de anticorpo monoclonal anti-CD22-exotoxina de *Pseudomonas*, etc.) e radioimunoterapia (por exemplo, conjugado de anticorpo monoclonal anti-CD20 com  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , ou  $^{131}\text{I}$ , etc.).

---

Os medicamentos anti-câncer podem ser administrados com um excipiente farmacêutico adequado, se necessário, e podem ser realizados por meio de qualquer dos modos de administração aceitos. Assim, a administração pode ser, por exemplo, oral, bucal, sublingual, gengival, palatal, intravenosa, tópica, subcutânea, transcutânea, transdérmica, intramuscular, intra-articular, parenteral, intra-arterial, intradérmica, intraventricular, intracranial, intraperitoneal, intravesical, intratecal, intralesional, intranasal, retal, vaginal ou por inalação. "Co-administrar" significa que um medicamento anti-câncer é administrado ao mesmo tempo, exatamente antes ou exatamente após a administração de um segundo medicamento (por exemplo, um outro medicamento anti-câncer, um medicamento usado para reduzir os efeitos colaterais associados à terapia com medicamento anti-câncer, um agente radioterapêutico, um agente terapêutico hormonal, um agente imunoterapêutico, etc.).

Uma quantidade terapeuticamente efetiva de um medicamento anti-câncer pode ser administrada repetidamente, por exemplo, pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais vezes, ou a dose pode ser administrada por infusão contínua. A dose pode ter as formas de dosagem sólida, semi-sólida, em pó liofilizado, ou líquida, tais como, por exemplo, comprimidos, pílulas, pelotas, cápsulas, pós, soluções, suspensões, emulsões, supositórios, enemas de retenção, cremes, emplastros, loções, géis, aerossóis, espumas ou similares, preferivelmente em formas de dosagem única adequadas para administração simples de dosagens precisas.

Da maneira aqui usada, o termo "forma de dosagem única" refere-se a unidade fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para sujeitos humanos e outros mamíferos, cada unidade contendo uma quantidade pré-determinada de um medicamento anti-câncer calculado para produzir o início, tolerabilidade e/ou efeito terapêutico desejados, em associação com um excipiente farmacêutico adequado (por exemplo, uma

---

ampola). Além disso, as formas de dosagem mais concentradas podem ser preparadas, a partir das quais as formas de dosagem única mais diluídas podem então ser produzidas. As formas de dosagem mais concentradas conterão assim substancialmente, por exemplo, pelo menos mais de 1, 2, 3, 4, 5, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais vezes a quantidade do medicamento anti-câncer.

Os métodos para preparar tais formas de dosagem são conhecidos pelos versados na técnica (ver, por exemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). As formas de dosagem incluem tipicamente um veículo ou excipiente farmacêutico convencional e podem incluir adicionalmente outros agentes medicinais, veículos, adjuvantes, diluentes, melhoradores de permeação tecidual, solubilizantes e similares. Os excipientes apropriados pode ser adaptados à forma de dosagem particular e via de administração por métodos bem conhecidos na tecnologia (ver, por exemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra).

Exemplos de excipientes adequados incluem, mas sem limitação, lactose, dextrose, sacarose, sorbitol, manitol, amidos, goma acácia, fosfato de cálcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de cálcio, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, celulose, água, saline, xarope, metilcelulose, etilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e ácidos poliacrílicos tais como carbopóis, por exemplo, Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, etc. As formas de dosagem podem incluir adicionalmente agentes de lubrificação tais como talco, estearato de magnésio e óleo mineral, agentes de umectação, agentes emulsificantes, agentes de suspensão, agentes de conservação tais como metil, etil e propil-hidróxi-benzoatos (isto é, os parabenos), agentes de ajuste de pH tais como ácidos e bases inorgânicos e orgânicos, agentes adoçantes e agentes flavorizantes. As formas de dosagem também podem compreender contas de polímero biodegradável, dextrano e complexos de inclusão de ciclodextrina.

---

Para a administração oral, a dose terapeuticamente efetiva pode estar na forma de comprimidos, cápsulas, emulsões, suspensões, soluções, xaropes, aspersões, tabletes, pós e formulações de liberação contínua. Os excipientes adequados para administração oral incluem graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, celulose, glicose, gelatina, sacarose, carbonato de magnésio e similares.

Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente efetiva apresenta a forma de uma pílula, comprimido ou cápsula e, assim, a forma de dosagem pode conter, junto com um medicamento anti-câncer, qualquer dos seguintes: um diluente tal como lactose, sacarose, fosfato de dicálcio e similares; um desintegrante tal como amido ou derivados destes; um lubrificante tais como estearato de magnésio e similares; e um aglutinante tal como amido, goma acácia, polivinilpirrolidona, gelatina, celulose e derivados destes. Um medicamento anti-câncer também pode ser formulado em um supositório disposto, por exemplo, em um veículo de polietileno glicol (PEG).

As formas de dosagem líquida podem ser preparadas dissolvendo ou dispersando um medicamento anti-câncer e, opcionalmente, um ou mais adjuvantes farmaceuticamente aceitáveis em um veículo tais como, por exemplo, salina aquosa (por exemplo, 0,9 % p/v de cloreto de sódio), dextrose aquosa, glicerol, etanol e similares, para formar uma solução ou suspensão, por exemplo, para administração oral, tópica ou intravenosa. Um medicamento anti-câncer também pode ser formulado em um enema de retenção.

Para a administração tópica, a dose terapeuticamente efetiva pode estar na forma de emulsões, loções, géis, espumas, cremes, geléias, soluções, suspensões, emplastos e adesivos transdérmicos. Para a administração por inalação, um medicamento anti-câncer pode ser distribuído como um pós seco ou na forma líquida por meio de um nebulizador. Para a administração parenteral, a dose terapeuticamente efetiva pode estar na forma

de soluções injetáveis estéreis e pós embalados estéreis. Preferivelmente, as soluções injetáveis são formuladas em um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5.

5 A dose terapeuticamente efetiva também pode ser fornecida em uma forma liofilizada. Tais formas de dosagem podem incluir um tampão, por exemplo, bicarbonato, para reconstituição antes da administração, ou o tampão pode ser incluído na forma de dosagem liofilizada para reconstituição, por exemplo, com água. A forma de dosagem liofilizada pode compreender adicionalmente um vasoconstritor adequado, por exemplo, epinefrina. A forma de dosagem liofilizada pode ser fornecida em uma seringa, embalada  
10 opcionalmente em combinação com o tampão para reconstituição, de maneira tal que a forma de dosagem reconstituída possa ser imediatamente administrada a um sujeito.

Um sujeito também pode ser monitorado em intervalos de tempo periódicos para avaliar a eficiência de um certo regime terapêutico. Por  
15 exemplo, os estados de ativação de certas proteínas de fusão oncogênicas, e/ou moléculas de transdução de sinal, podem mudar com base no efeito terapêutico de tratamento com um ou mais dos medicamentos anti-câncer aqui descritos. O sujeito pode ser monitorado para avaliar a resposta e entender os efeitos de certos medicamentos ou tratamentos em uma abordagem  
20 individualizada. Adicionalmente, os sujeitos que inicialmente respondem a um medicamento anti-câncer específico, ou combinação de medicamentos anti-câncer, podem se tornar refratários ao medicamento ou combinação de medicamento, indicando que estes sujeitos desenvolveram resistência ao medicamento. Estes sujeitos podem ter sua terapia atual interrompida e um  
25 tratamento alternativo pode ser prescrito, de acordo com os métodos da presente invenção.

Em certos aspectos, os métodos aqui descritos podem ser usados junto com painéis de marcadores de expressão de gene que prevê a  
~~probabilidade do prognóstico e/ou recorrência de câncer em várias~~

---

populações. Estes painéis de gene podem ser usados para identificar sujeitos que são improváveis de experimentar a recorrência e, assim, improváveis de se beneficiar com a quimioterapia adjuvante. Os painéis de expressão podem ser usados para identificar sujeitos que podem evitar de maneira segura a quimioterapia adjuvante, sem afetar de maneira negativa os resultados livres de doença e de sobrevivência total.

Além disso, em outros certos aspectos, os métodos aqui descritos podem ser usados junto com painéis de marcadores de expressão de gene que identificam os tumores originais para cânceres de origem desconhecida (CUP). Estes painéis de gene podem ser usados na identificação de sujeitos com câncer metastático, que se beneficiariam da terapia coerente com aquela fornecida aos sujeitos diagnosticados inicialmente com câncer. Os sistemas adequados incluem, mas sem limitação, o ensaio Avicara CancerTYPE ID, um ensaio de expressão a base de RT-PCR, que mede 92 genes para identificar o sítio de origem primária para 39 tipos de tumor, e o teste de tecido de origem Pathwork<sup>®</sup>, que mede a expressão de mais de 1.600 genes em um microarranjo, e compara uma "assinatura" de expressão de gene do tumor contra aqueles de 15 tipos de tecido conhecido.

### VIII. Exemplos

Os exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar, mas não limitar, a invenção reivindicada.

**Exemplo 1. Detecção de célula única usando um ELISA de microarranjo com detector de proximidade dupla com amplificação de sinal de tiramida.**

Este exemplo ilustra um ELISA em sanduíche em microarranjo com detector de proximidade dupla, multiplex, de alto rendimento, com faixa dinâmica superior que é adequada para analisar os estados de ativação de proteínas de fusão, e moléculas de transdução de sinal, em extratos celulares preparados a partir de células isoladas. Em modalidades

particulares, o ensaio de proximidade está no formato de um microarranjo endereçável.

1) Anticorpo de captura foi impresso em uma lâmina 16-pad FAST (Whatman Inc.) com uma diluição em série de 1 mg/mL a 0,004 mg/mL. Alternativamente, uma diluição em série de 2 vezes de cada anticorpo de captura (0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL e 0,0625 mg/mL) pode ser usada, e pontos duplos ou quádruplos podem ser feitos para cada diluição de anticorpo. Para detectar a proteína de fusão BCR-ABL, um anticorpo de captura exemplar compreende um anticorpo anti-BCR monoclonal ou policlonal.

2) Após secagem por toda a noite, a lâmina foi bloqueada com tampão de bloqueio Whatman.

3) 80 µL de lisado celular foi adicionado em cada peça com uma diluição seriada de 10 vezes. A lâmina foi incubada por duas horas em temperatura ambiente.

4) Após seis lavagens com TBS-Tween, foram adicionados nas lâminas 80 µL de anticorpos de detecção, para o ensaio de proximidade, diluídos em em TBS-Tween/2 % de BSA/1 % de FBS. Para detectar a proteína de fusão BCR-ABL, os anticorpos de detecção exemplares incluem: (1) um anticorpo anti-ABL monoclonal ou policlonal conjugado diretamente com a glicose oxidase (GO); e (2) um anticorpo monoclonal ou policlonal que reconhece ABL fosforilada, conjugado diretamente com peroxidase de rábano silvestre (HRP). A incubação ocorreu por 2 horas em temperatura ambiente.

5) Alternativamente, a etapa de detecção pode utilizar um conjugado de biotina do anticorpo que reconhece ABL fosforilada. Nestes exemplos, após seis lavagens, foi incluída uma etapa de incubação sequencial adicional com estreptavidina-HRP por 1 hora.

6) Alternativamente, a etapa de detecção pode utilizar um ~~conjugado de GO mediado por oligonucleotídeo do anticorpo anti-ABL.~~

---

Tanto o conjugado ligado diretamente quanto o conjugado ligado à biotina-estreptavidina (SA) de HRP no anticorpo de ABL fosforilada pode ser usado.

6) Para amplificação de sinal, 80 µL de biotina-tiramida a 5 µg/mL foram adicionados e reagidos por 15 minutos. A lâmina foi lavada seis vezes com TBS-Tween, duas vezes com 20 % de DMSO/TBS-Tween, e uma vez com TBS.

7) 80 µL de SA-Alexa 555 foram adicionados e incubados por 30 minutos. A lâmina foi então lavada duas vezes, seca por 5 minutos, e examinada em um visualizador de microarranjo (Perkin-Elmer, Inc.).

O formato de microarranjo de ensaio de proximidade aqui descrito exhibe vantajosamente muito pouco fundamento (por exemplo, comparado aos ensaios com dois-anticorpos), em virtude da maior especificidade obtida pela detecção da proximidade entre dois anticorpos de detecção.

## **Exemplo 2. Geração de perfis de ativação para seleção de medicamento.**

As composições e métodos da presente invenção podem ser aplicados para a seleção de medicamento no tratamento de câncer. Como um exemplo não limitante, a presente invenção pode ser usada na identificação da presença e/ou atividade de uma ou uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas associadas com malignidades hematológicas, a fim de fornecer o tratamento apropriado para pacientes com estes tipos de câncer. Um protocolo típico implica na geração de dois perfis, um perfil de ativação de referência e um perfil de ativação teste, que são então comparados para determinar a eficiência de um regime de tratamento com medicamento particular (ver figura 2).

### Perfil de ativação de referência

Para produzir um perfil de ativação de referência, uma amostra de sangue é obtida a partir de um paciente com um tipo específico de câncer (por exemplo, leucemia tal como CML) antes do tratamento com

---

medicamento anti-câncer. As células tumorais são isoladas a partir da amostra de sangue usando, por exemplo, qualquer das técnicas descritas aqui com mais detalhes. As células isoladas podem ser estimuladas *in vitro* com um ou mais fatores de crescimento. As células estimuladas são então lisadas para produzir um extrato celular. O extrato celular é aplicado a um arranjo direcionável que contém uma diluição em série de um painel de anticorpos de captura específicos para uma ou uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas (sozinhas ou em combinação com uma ou uma pluralidade de moléculas de transdução de sinal), cujos estados de ativação podem ser alterados nos tipos de câncer do paciente. A detecção simples ou ensaios de proximidade são realizados usando os anticorpos de detecção apropriados (por exemplo, anticorpos independentes do estado de ativação e/ou anticorpos dependentes do estado de ativação) para determinar o estado de ativação de cada analito de interesse. Um perfil de ativação de referência é assim gerado, fornecendo os estados de ativação de analitos específicos, tais como proteínas de fusão oncogênicas no câncer do paciente, na ausência de qualquer dos medicamentos anti-câncer.

#### Perfil de ativação teste

Para obter um perfil de ativação teste, uma segunda amostra de sangue é obtida do paciente com um tipo específico de câncer (por exemplo, leucemia tal como CML) tanto antes do tratamento com medicamento anti-câncer quanto após a administração de um medicamento anti-câncer (por exemplo, em qualquer período em todo o curso de tratamento do câncer). As células de tumor são isoladas a partir da amostra de sangue. Se as células isoladas forem obtidas de um paciente que não está recebendo tratamento com um medicamento anti-câncer, as células isoladas são incubadas com medicamentos anti-câncer que alvejam uma ou mais das proteínas de fusão oncogênicas ativadas, e/ou moléculas de transdução de sinal, determinadas a partir do perfil de ativação de referência descrito anteriormente. Por exemplo,

---

se for determinada a partir do perfil de ativação de referência no qual a proteína de fusão BCR-ABL é ativada, então as células podem ser incubadas com imatinib (Gleevec<sup>®</sup>). As células isoladas podem então ser estimuladas *in vitro* com um ou mais fatores de crescimento. As células isoladas são então

5 lisadas para produzir um extrato celular. O extrato celular é aplicado no arranjo direcionável e a detecção simples ou ensaios de proximidade são realizados para determinar o estado de ativação de cada analito de interesse. Um perfil de ativação teste para o paciente é assim gerado, fornecendo os estados de ativação de analitos específicos, tais como proteínas de fusão

10 oncogênicas no câncer do paciente na presença de medicamentos anti-câncer específicos.

#### Seleção de medicamento

Os medicamentos anti-câncer são determinados para ser adequados ou inadequados para o tratamento do câncer do paciente,

15 comparando o perfil de ativação teste com o perfil de ativação de referência. Por exemplo, se o tratamento com medicamento fizer com que a maioria ou todas as proteínas de fusão oncogênicas, e/ou moléculas de transdução de sinal, sejam substancialmente menos ativadas que na ausência dos medicamentos, por exemplo, uma mudança de ativação forte sem os

20 medicamentos para ativação fraca ou muito fraca com os medicamentos, então o tratamento é determinado para ser adequado para o câncer do paciente. Em tais exemplos, o tratamento é tanto iniciado com o medicamento anti-câncer adequado em um paciente que não recebeu terapia com medicamento, quanto o tratamento subsequente é continuado com o

25 medicamento anti-câncer adequado em um paciente que já está recebendo o medicamento. Entretanto, se o tratamento com medicamento for considerado inadequado para o tratamento do paciente com câncer, diferentes medicamentos são selecionados e usados para gerar um novo perfil de

~~ativação teste, que é então comparado ao perfil de ativação de referência. Em~~

---

tais exemplos, o tratamento é tanto iniciado com um medicamento anti-câncer adequado em um paciente que não recebeu terapia com medicamento, quanto o tratamento subsequente é alterado para um medicamento anti-câncer adequado em um paciente que recebe atualmente o medicamento inadequado.

5 O protocolo descrito neste exemplo também é usado para identificar pacientes que são resistentes à terapia com um inibidor de tirosina quinase, tal como imatinib, em virtude das mutações na proteína quinase alvo (por exemplo, BCR-ABL), do não cumprimento do regime terapêutico e/ou da administração de uma dose de medicamento subideal.

### 10 **Exemplo 3. Proteínas de fusão oncogênicas exemplares associadas ao câncer.**

Este exemplo fornece uma lista não extensa de translocações em tumores humanos que causam a formação de proteínas de fusão oncogênicas e seus neoplasmas associados.

15 Linfoma de Burkitt: translocação do gene c-myc t(8;14) (q24;q32). A oncoproteína quimérica comum é c-myc/IGH.

AML: translocação de uma parte de cromossomo 8 para o cromossomo 21. A oncoproteína quimérica resultante é RUNX1/ETO. Uma outra translocação t(12; 15) (p 13;q25) resulta na oncoproteína quimérica  
20 TEL/TrkC (quinase).

CML: cromossomo Filadélfia é uma translocação que resulta em BCR/ABL (quinase).

Sarcoma de Ewing: translocação entre os cromossomos 11 e 22. A oncoproteína quimérica resultante é EWS/FLI (fator de transcrição).

25 ALL: Proteínas oncogênicas quiméricas:

| Translocação citogenética | Anormalidade genética molecular | %     |
|---------------------------|---------------------------------|-------|
| cryptic t(12;21)          | TEL/AML1 (Quinase)              | 25.4% |
| t(1;19)(q23;p13)          | E2A/PBX (PBX1)                  | 4.8%  |
| t(9;22)(q34;q11)          | Fusão BCT/ABL (P185)            | 1.6%  |
| t(4;11)(q21;q23)          | Fusão MLL/AF4                   | 1.6%  |
| t(8;14)(q24;q32)          | Fusão IGH/MYC                   |       |
| t(11;14)(p13;q11)         | Fusão TCR/RBTN2                 |       |

DFSP: Mais de 95 % dos tumores DFSP apresentam a translocação cromossômica t(17;22) que resulta na oncoproteína quimérica COL1 A1/PDGF (que se liga e ativa PDGFR).

5 Leucemia pró-mielocítica aguda: uma translocação determinada como t( 15; 17) (q22;q 12). A oncoproteína quimérica resultante é RAR $\alpha$ /PML (proteína complexa de transcrição).

10 Pró-leucemia linfoblástica aguda de célula B: translocação t(17;19), que resulta na oncoproteína quimérica E2A/HLF (inibidor de apoptose).

Leucemia aguda de pré-célula B: translocação t(1; 19). A oncoproteína quimérica é E2A/Pbx1 (substrato de quinase).

Rabdomiossarcoma: translocação de t(2:13) (q35;q14), que resulta na oncoproteína quimérica PAX3/FKHR (fator de transcrição).

15 Uma malignidade de tecido mole de criança muito jovem: t(12;15) (p13;q25) rearranjo que resulta na oncoproteína quimérica a seguir: proteína tirosina quinase ETV6/NTRK3 (quinase).

Carcinoma de tireóide papilar: a oncoproteína quimérica é RET/PTC (quinase).

20 Câncer de próstata: a oncoproteína quimérica é TMRSS/ERG (quinase).

Exemplos adicionais de translocações em tumores de humanos que causam a formação de proteínas de fusão oncogênicas e seus neoplasmas associados:

| Oncogene           | Neoplasma                                                |
|--------------------|----------------------------------------------------------|
| bcr/abl            | Leucemia mielogênica crônica, leucemia linfocítica aguda |
| dek/can            | Leucemia mieloide aguda                                  |
| E2A/pbx1           | Leucemia aguda de pré-célula B                           |
| PML/RAR            | Leucemia pró-mielocítica aguda                           |
| ?/erg              | Leucemia mieloide                                        |
| irel/urg           | Linfoma de célula B                                      |
| CBF $\beta$ /MYH11 | Leucemia mieloide aguda                                  |
| aml1/mtg8          | Sarcoma de Ewing                                         |
| ews/fli            | Linfoma de célula B                                      |
| hrx/af4            | Leucemias agudas                                         |
| NPM/ALK            | Linfomas de célula grande                                |

Adaptado de G.M. Cooper, *Oncogenes*, 2ª ed. Boston e Londres: Jones e Bartlett, 1995.

#### **Exemplo 4. Imunoensaio mediado por proximidade para a detecção dos níveis totais e ativados de proteínas de fusão oncogênicas.**

##### Introdução

O oncogene BCR-ABL é formado por uma translocação do gene ABL normal localizado no braço longo do cromossomo 9, na parte N-terminal do gene BCR localizado no braço longo do cromossomo 22, para formar o cromossomo Filadélfia. Dependendo de onde o gene ABL translocado é unido no N-terminal do gene BCR, tamanhos diferentes dos produtos de gene BCR-ABL são produzidos, com o mais prevalente sendo o produto de gene p210 BCR-ABL, como o oncogene que causa CML e um subconjunto de ALL. Outros produtos de gene adicionais, tais como p185 e p230 BCR-ABL, também são produzidos. Em particular, o produto de gene p210 BCR-ABL é responsável por causar AML. Esta proteína contém 1.790 aminoácidos e é composta de um domínio de oligomerização (OLI) de BCR na terminação N, seguido pelo domínio S/T quinase de BCR, um inserto de sequência de aminoácidos de BCR que não está presente em BCR normal,

seguido pelos domínios SH3, SH2 e Y quinase de ABL, bem como o domínio rico em prolina C-terminal de ABL.

#### Fundamento clínico

Embora a maioria dos pacientes com leucemia mielogênica crônica (CML) na fase crônica respondam bem à imatinib, alguns pacientes não atingem o ponto final desejado, e outros eventualmente podem sucumbir à resposta ou são intolerantes. Com relação ao tratamento com 400 mg/dia de imatinib (Gleevec): existe uma resposta citogenética completa (CCyR) em 70-80 % dos pacientes; existe uma perda de CCyR em uma taxa de 4 a 7 % /ano nos primeiros 3 anos, e então 1 a 2 % /ano a partir de então; a taxa de sobrevivência completa após 7 anos é de 90 %, a mesma taxa sem sobrevivência após 7 anos é de 81 % e a taxa de recaída é de cerca de 30 % em 5 anos. Existe uma resposta melhor ao tratamento com 800 mg/dia de imatinib (Gleevec) (CCyR = 95 %; Taxa de recaída = 5 %), mas uma dose como esta de imatinib é também mais tóxica. Nilotinib apresenta uma eficiência similar com 800 mg/dia de imatinib, mas é mais tóxico que imatinib.

A inibição completa de BCR-ABL rende melhores respostas ao Gleevec, mas a inibição incompleta de BCR-ABL resulta em recaída com relação ao Gleevec. Portanto, a detecção em tempo real do nível de expressão e do grau de ativação de BCR-ABL beneficiaria pacientes com CML em terapia alvejada, ajustando a dose do medicamento para inibir eficientemente o alvo, minimizando ao mesmo tempo a toxicidade. Por exemplo, aqueles pacientes com inativação incompleta com 400 mg/dia de Gleevec podem ser colocados em uma dose maior (por exemplo, 800 mg/dia) mais rápido para garantir a resposta.

#### Desafio de diagnóstico

Os níveis elevados da linha de base de BCR e ABL de tamanho total tornam muito difícil a detecção relativamente baixa de proteína

de fusão BCR-ABL em abundância. Além disso, os ensaios atuais que detectam os níveis de fosforilação de BCR-ABL não apresentam a sensibilidade de detectar a fosforilação em amostras de sangue clínicas. Além do mais, os anticorpos contra proteínas de fusão, tal como BCR-ABL, não são muito específicos para variantes múltiplos da proteína de fusão.

#### Ensaio de detecção de BCR-ABL inédito

A figura 3A ilustra um ensaio de proximidade exemplar (300) para detectar a presença (nível total) e/ou estado de ativação (nível de fosforilação) de uma proteína de fusão oncogênica, tal como BCR-ABL (310). A figura 3B ilustra uma modalidade alternativa (400) dos ensaios de proximidade da presente invenção para detectar a presença (nível total) e/ou estado de ativação (nível de fosforilação) de BCR-ABL (410), usando os anticorpos de ligação.

Os exemplos não limitantes de anticorpos adequados para uso nos métodos para medir os níveis de proteína BCR-ABL total e/ou ativada, da maneira ilustrada nas figuras 3A-3B, incluem aqueles apresentados na tabela 1 anterior.

#### Resultados

A figura 4 ilustra o sinal de BCR-ABL em células K562 (isto é, células de uma linhagem celular de leucemia mielogênica crônica humana) após a remoção de BCR livre de tamanho total, usando um anticorpo específico para a região carboxil terminal de BCR de tamanho total conjugado com as contas, de acordo com o ensaio de proximidade exemplar representado na figura 3A. Em particular, a figura 4 demonstra que o sinal de BCR-ABL não é afetado por remoção de BCR livre a partir de uma amostra de paciente usando o ensaio de proximidade inédito da presente invenção.

A figura 5 ilustra o sinal de BCR em células K562 após a remoção de BCR livre, usando um anticorpo específico para a região carboxil terminal de BCR de tamanho total conjugado com as contas, de acordo com o ensaio de proximidade exemplar representado na figura 3A. Da maneira

mostrada na figura 5, uma diminuição no sinal de BCR em 10.000 células demonstra que apenas BCR é removida usando o ensaio de proximidade inédito da presente invenção.

5 A figura 6 ilustra a detecção de níveis totais e fosforilados de BCR-ABL em células K562, usando o ensaio de proximidade exemplar representado na figura 3A.

### Conclusão

10 Este exemplo demonstra que os ensaios de proximidade exemplares, representados nas figuras 3A e 3B, para detectar a presença e/ou estado de ativação de BCR-ABL são vantajosos para pelo menos as razões a seguir: (1) proteínas BCR de tamanho total podem ser removidas de uma amostra de paciente, tal como sangue ou aspirado de medula óssea, usando um rótulo de diminuição específico para a região C-terminal de BCR; (2) uma vez que a BCR de tamanho total é removida da amostra do paciente, os anticorpos de captura específicos para a região N-terminal de BCR podem 15 capturar as proteínas de fusão BCR-ABL; e (3) uma vez que as proteínas de fusão BCR-ABL são capturadas, seus níveis de expressão e ativação podem ser detectados com alta sensibilidade por meio de canalização por proximidade, em que um sinal detectável simples, que está correlacionado aos 20 níveis de proteína total ou ativada de BCR-ABL, é gerado apenas mediante a ligação de todos os três anticorpos, resultando em melhor especificidade do ensaio, menos fundamento e detecção simplificada.

### **Exemplo 5. Detecção dos níveis totais e ativados de BCR-ABL sem interferência de BCR e/ou ABL de tamanho total.**

25 Este exemplo fornece dados experimentais adicionais que demonstram as vantagens dos ensaios de proximidade exemplares, representados nas figuras 3A e 3B, para detectar a presença (nível total) e/ou estado de ativação (nível de fosforilação) de BCR-ABL. Em uma modalidade particular, as proteínas BCR de tamanho total são removidas de um extrato de

---

células (por exemplo, células brancas do sangue malignas, tais como células de leucemia) obtido de uma amostra do paciente ou de um extrato de células obtido de uma linhagem celular (por exemplo, uma linhagem celular de leucemia), usando um rótulo de diminuição específico para a região C-terminal de BCR. Uma vez que a BCR de tamanho total é removida do extrato celular, os anticorpos de captura específicos para a região N-terminal de BCR podem capturar as proteínas de fusão BCR-ABL. Uma vez que as proteínas de fusão BCR-ABL são capturadas, seus níveis de expressão e ativação podem ser detectados com alta sensibilidade por meio de canalização por proximidade, em que um sinal detectável simples, que está correlacionado aos níveis totais ou ativados de proteína BCR-ABL, é gerado apenas mediante a ligação dos três anticorpos, resultando vantajosamente em melhor especificidade do ensaio, menos fundamento e detecção simplificada.

A figura 7 ilustra o nível de fosforilação ("BCR-ABL fosfo") e a quantidade total ("BCR-ABL total") de BCR-ABL detectado em células K562 (isto é, células de uma linhagem celular de leucemia mielogênica crônica humana) após a remoção de BCR livre de tamanho total, usando um anticorpo específico para a região carboxil terminal de BCR de tamanho total conjugado com as contas de acordo com o ensaio de proximidade exemplar representado na figura 3A. Em particular, as figuras 7A e 7B mostram que os sinais de BCR-ABL fosforilada e total não foram alterados após colocar um extrato de células K562 em contato com os anticorpos específico para a terminação C de BCR de tamanho total, acoplados com as contas para remover a proteína BCR livre, usando o ensaio de proximidade inédito da presente invenção. A figura 7C ilustra que a BCR livre de tamanho total foi realmente removida do extrato celular após o tratamento com contas acopladas ao anticorpo C-terminal de BCR.

A figura 8 fornece uma outra ilustração do sinal de BCR-ABL fosforilada em células K562 após a remoção de BCR livre, usando um

---

anticorpo específico para a região carboxil terminal de BCR de tamanho total conjugado com as contas de acordo com o ensaio de proximidade exemplar representado na figura 3A. Em particular, a figura 8A fornece uma comparação de microarranjo do sinal de BCR-ABL fosforilada detectado em lisados de célula K562, com ou sem a remoção de BCR de tamanho total ("Contas não tratadas" = BCR não removida versus "Contas tratadas" = BCR removida com contas que contém um anticorpo específico para a terminação C de BCR de tamanho total conjugado a estas). A figura 8B fornece uma representação gráfica dos dados de microarranjo com unidades de fluorescência relativa (RFU) como uma função do número celular. Estas figuras demonstram que o sinal de BCR-ABL fosfo não foi alterado mediante a remoção de BCR de tamanho total de um extrato de células K562, usando o ensaio de proximidade inédito da presente invenção.

A figura 9 fornece uma outra ilustração do sinal de BCR-ABL total em células K562 após a remoção de BCR livre, usando um anticorpo específico para a região carboxil terminal de BCR de tamanho total conjugado com as contas de acordo com o ensaio de proximidade exemplar representado na figura 3A. Em particular, a figura 9A fornece uma comparação de microarranjo do sinal de BCR-ABL total detectado em lisados de célula K562, com ou sem a remoção de BCR de tamanho total ("Contas não tratadas" = BCR não removida versus "Contas tratadas" = BCR removida com contas que contém um anticorpo específico para a terminação C de BCR de tamanho total conjugado a estas). A figura 9B fornece uma representação gráfica dos dados de microarranjo com unidades de fluorescência relativa (RFU) como uma função do número celular. Estas figuras demonstram que o sinal de BCR-ABL total não foi alterado mediante a remoção de BCR de tamanho total de um extrato de células K562, usando o ensaio de proximidade inédito da presente invenção.

A figura 10 fornece uma outra ilustração da remoção de BCR livre de tamanho total a partir de um extrato de células K562, após colocar o extrato celular em contato com contas acopladas ao anticorpo C-terminal de BCR. Em particular, a figura 10A fornece uma comparação de microarranjo do sinal total de BCR detectado em lisados de célula K562, com ou sem a remoção de BCR de tamanho total ("Contas não tratadas" = BCR não removida versus "Contas tratadas" = BCR removida com contas que contém um anticorpo específico para a terminação C de BCR de tamanho total conjugado a estas). A figura 10B fornece uma representação gráfica dos dados de microarranjo com unidades de fluorescência relativa (RFU) como uma função do número celular. Estas figuras demonstram que BCR de tamanho total foi reduzida virtualmente do extrato celular quando tratada com contas que contém um anticorpo específico para a terminação C de BCR de tamanho total. De fato, os extratos celulares que contém, por exemplo, menos de 1.000 células não produziram um sinal de BCR que foi significativamente acima do básico (0 células) quando incubados com contas acopladas ao anticorpo C-terminal de BCR.

A figura 11 ilustra que as proteínas BCR e ABL livres de tamanho total, mas não a proteína de fusão BCR-ABL, estão presentes nas células brancas do sangue (WBCs). A figura 12 mostra que a BCR livre de tamanho total presente em WBCs inibiu o sinal de BCR-ABL fosfo em extratos de célula K562, quando tais extratos de célula K562 foram aumentados com extratos de WBC. A figura 13 ilustra o sinal de BCR-ABL total em células K562 aumentadas com extratos de WBC após a remoção de BCR livre, usando um anticorpo específico para a região carboxil terminal de BCR de tamanho total conjugado com as contas. Em particular, A figura 13A mostra que o sinal de BCR livre foi saturado quando os extratos de célula K562 foram aumentados com os extratos de WBC. Após o tratamento com contas acopladas ao anticorpo BCR, a BCR livre foi removida. A figura 13B

mostra que o sinal de BCR-ABL não foi alterado com ou sem o tratamento com contas no mesmo experimento.

Em algumas modalidades, a proteína ABL de tamanho total pode ser adicionalmente ou alternativamente removida do extrato de células (por exemplo, células brancas do sangue malignas, tais como células de leucemia) obtido de uma amostra do paciente, ou do extrato de células obtido de uma linhagem celular (por exemplo, uma linhagem celular de leucemia), antes da captura e detecção da expressão e/ou ativação de BCR-ABL, usando um rótulo de diminuição específico para a região amino terminal de ABL de tamanho total. Um exemplo não limitante de um rótulo de diminuição como este é uma conta na qual um anticorpo específico para a região N-terminal de ABL de tamanho total é afixado.

**Exemplo 6. Detecção dos níveis totais e ativados de BCR-ABL em células tratadas com inibidores da atividade de BCR-ABL quinase.**

Este exemplo demonstra que os inibidores de BCR-ABL, tais como imatinib (Gleevec<sup>®</sup>), nilotinib (Tasigna<sup>®</sup>), e dasatinib (Sprycel<sup>®</sup>), inibiram a ativação dose-dependente (isto é, fosforilação), mas não a expressão (isto é, níveis totais), de proteína BCR-ABL em células K562 (isto é, células de uma linhagem celular de leucemia mielogênica crônica humana).

Em particular, as figuras 14A e 14B ilustram que o inibidor de BCR-ABL, imatinib (Gleevec<sup>®</sup>), inibiu a ativação dose-dependente (isto é, fosforilação), mas não a expressão (isto é, níveis totais), de proteína BCR-ABL em células K562. A figura 14C mostra a razão fosfo/total de BCR-ABL mediante inibição com imatinib, que está correlacionada com o percentual de inibição do sinal de BCR-ABL fosfo com o tratamento com imatinib.

As figuras 15A e 15B ilustram que o inibidor de BCR-ABL, nilotinib (Tasigna<sup>®</sup>), inibiu a ativação dose-dependente (isto é, fosforilação), mas não a expressão (isto é, níveis totais), de proteína BCR-

---

ABL em células K562. A figura 15C mostra a razão fosfo/total de BCR-ABL mediante inibição com nilotinib, que está correlacionada com o percentual de inibição do sinal de BCR-ABL fosfo com tratamento com nilotinib.

As figuras 16A e 16B ilustram que o inibidor de BCR-ABL, dasatinib (Sprycel<sup>®</sup>), inibiu a ativação dose-dependentemente (isto é, fosforilação), mas não a expressão (isto é, níveis totais), de proteína BCR-ABL em células K562. A figura 16C mostra a razão fosfo/total de BCR-ABL mediante a inibição com dasatinib, que está correlacionada com o percentual de inibição do sinal de BCR-ABL fosfo com o tratamento com dasatinib.

#### **Exemplo 7. Detecção dos níveis totais e ativados do substrato BCR-ABL CRKL em várias linhagens celulares de câncer.**

Este exemplo demonstra a detecção dos níveis totais e ativados (fosforilado) do substrato de BCR-ABL CRKL, da maneira determinada por um ELISA em sanduíche. Em outras modalidades, a presença e/ou estado de ativação de um substrato de BCR-ABL, tal como CRKL, pode ser medida usando um ensaio de proximidade tal como um imunensaio de proximidade colaborativa (COPIA) descrito no pedido PCT PCT/US2010/042182, depositado em 15 de julho 2010, e nas publicações de patente U.S. 20080261829, 20090035792 e 20100167945, cujas revelações são aqui incorporadas pela referência na sua íntegra, com todos os propósitos.

A figura 17 ilustra que CRKL está tanto presente quanto ativado (isto é, fosforilado) em células K562 (isto é, células de uma linhagem celular de leucemia mielogênica crônica humana). A figura 18 mostra que CRKL está presente em células A431 (isto é, células de uma linhagem celular de carcinoma epidermóide humano), e é ativado (isto é, fosforilado) mediante tratamento com EGF. A figura 19 mostra que CRKL está presente em células T47D (isto é, células de uma linhagem celular de tumor de epitélio ductal de mama em humano), mas não é ativado (isto é, fosforilado) mediante tratamento com EGF. A figura 20 mostra que CRKL está presente em células

---

T47D e é ativado (isto é, fosforilado) em baixos níveis mediante tratamento com heregulina (HRG). A figura 21 mostra que CRKL está presente em células MCF-7 (isto é, células de uma linhagem celular de adenocarcinoma de mama em humano) e é ativado (isto é, fosforilado) em baixos níveis mediante tratamento com heregulina (HRG). A figura 22 ilustra a presença de CRKL ativado (isto é, fosforilado) nas células brancas do sangue (WBCs) de amostras de paciente, com o nível de ativação sendo diferente entre os doadores.

**Exemplo 8. Detecção dos níveis totais e ativados do substrato BCR-ABL JAK2 em várias linhagens celulares de câncer.**

Este exemplo demonstra a detecção dos níveis ativados (fosforilados) do substrato de BCR-ABL JAK2, da maneira determinada por um ELISA em sanduíche. Em outras modalidades, a presença e/ou estado de ativação de um substrato de BCR-ABL, tal como JAK2, pode ser medida usando um ensaio de proximidade, tal como um imunoenensaio de proximidade colaborativa (COPIA) descrito no pedido PCT PCT/US2010/042182, depositado em 15 de julho de 2010, e publicação de patente U.S. 20080261829, 20090035792 e 20100167945, cujas revelações são aqui incorporadas pela referência na sua íntegra, com todos os propósitos.

A figura 23 ilustra que JAK2 é ativado (isto é, fosforilado) em células K562 (isto é, células de uma linhagem celular de leucemia mielogênica crônica humana) e células A431 (isto é, células de uma linhagem celular de carcinoma epidermóide humano).

**Exemplo 9. Isolamento de células a partir do sangue sem diluição de medicamento anti-câncer.**

Este exemplo demonstra a recuperação de células K562 (isto é, células de uma linhagem celular de leucemia mielogênica crônica humana), a partir do sangue, aumentada com células K562 usando conta magnética de captura com anticorpos anti-CD45, seguido pela preparação de um lisado celular de K562 e determinação do estado de expressão e/ou ativação de uma

---

ou mais proteínas de fusão oncogênicas (por exemplo, BCR-ABL), substratos destas, vias destas ou combinações destas. Este exemplo também demonstra a recuperação de células brancas do sangue a partir de amostras de sangue de paciente, usando conta magnética de captura com anticorpos anti-CD45 e/ou anti-CD15, seguido pela preparação de um lisado celular e determinação do estado da expressão e/ou ativação de uma ou mais proteínas de fusão oncogênicas (por exemplo, BCR-ABL), substratos destas, vias destas ou combinações destas. Eliminando a necessidade de qualquer das etapas de lavagem após o isolamento celular, os métodos aqui descritos são vantajosos em decorrência de células de interesse poderem ser recuperadas a partir do sangue sem mudar a concentração intracelular de um medicamento anti-câncer, tal como um inibidor de tirosina quinase. Como tal, os métodos descritos neste exemplo são contrários à prática aceita na técnica de lavar as células após o isolamento (por exemplo, células ligadas à conta de lavagem), e fornecer lisados celulares a partir de células recuperadas sem diluição substancial de um medicamento anti-câncer, tal como um inibidor de tirosina quinase (por exemplo, Gleevec<sup>®</sup>, Tasigna<sup>®</sup>, Sprycel<sup>®</sup>, etc.), dentro das células.

Recuperação de células K562 a partir de 1mL de sangue usando Dynacontas CD45

- 20 1. Preparar o tampão 1.
  - 1.1 Adicionar 500mg de BSA em 500 mL de PBS.
  - 1.2 Adicionar 2 mL de EDTA 0,5M.
2. Preparar sangue e reforço com células K562.
  - 2.1 Obter 10 mL de sangue total do doador.
  - 25 2.2 Diluir 1:1 a diluição de sangue com tampão 1.
  - 2.3 Fazer uma contagem celular de células K562 usando o contador de células automatizado.
  - 2.4 Adicionar 5e6, 1e6, 0.1e6 e 0 células K562 separadamente em 1mL de sangue diluído para cada concentração.

3. Lavar com dynacontas (Invitrogen Cat. No. 111.53D).

3.1 Transferir 100  $\mu$ L de contas para cada  $1e7$  células em um tubo eppendorf de 1,5 mL.

3.2 Adicionar 1mL de tampão 1 e misturar delicadamente.

5 3.3 Colocar o tubo no imã por 1 minuto.

3.4 Remover o sobrenadante.

3.5 Remover o tubo do imã e ressuspender em quantidades iguais de tampão 1, como o volume inicial de contas transferidas.

4. Isolamento de célula.

10 4.1 Adicionar 100  $\mu$ L de contas laçadas em cada amostra de sangue K562 aumentada.

4.2 Incubar as amostras em um rotor em uma temperatura fria (ou temperatura ambiente) por 20 minutos, 2 horas ou 1 hora.

4.3 Colocar amostras no imã e remover o sobrenadante.

15 5. Preparação de lisado celular.

5.1 Adicionar 1 mL de tampão de lise gelado às contas ligadas às  $5e6$  células K562

5.2 Adicionar 500  $\mu$ L de tampão de lise às contas ligadas às  $1e6$  células K562.

20 5.3 Adicionar 100  $\mu$ L de tampão de lise às contas ligadas às  $0,1e6$  células K562.

5.4 Vortexar e colocar no gelo por 20'; vortexar intermitentemente.

5.5 Centrifugar por 15' na velocidade máxima a 4 graus.

25 5.6 Transferir o sobrenadante para um tubo eppendorf para correr o microarranjo, por exemplo, realizando o imunoensaio mediado por proximidade aqui descrito

Isolamento de célula CML a partir da amostra de sangue do paciente usando Dynabeads CD45 e/ou CD15

1. Preparar o tampão 1.

- 1.1 Adicionar 500mg de BSA em 500 mL de PBS.

- 1.2 Adicionar 2 mL de EDTA 0,5M.

2. Preparar o sangue do paciente.

5                   2.1 Obter 2-3mL de sangue total do paciente usando EDTA (ou heparina) como um anti-coagulante.

- 2.2 Adicionar ou não inibidores de protease.

3. Lavar DynaBeads (Invitrogen Cat. No. 1 11.53D).

10                   3.1 Transferir 100  $\mu$ L (200  $\mu$ L, 300  $\mu$ L) de contas para cada 1 mL de amostra de sangue para um tubo eppendorf de 1,5 mL.

- 3.2 Adicionar 1 mL de tampão 1 e misturar delicadamente.

- 3.3 Colocar o tubo no imã por 1 minuto.

- 3.4 Remover o sobrenadante.

15                   3.5 Remover o tubo do imã e ressuspender em 100  $\mu$ L de tampão 1 como o volume inicial de contas transferidas.

4. Isolamento de células.

- 4.1 Adicionar os 100  $\mu$ L de contas lavadas em 1 mL de amostra de sangue em um tubo eppendorf de 1,5 mL.

20                   4.2 Incubar as amostras em um rotor em uma temperatura fria (ou temperatura ambiente) por 20 minutos, 2 horas ou 1 hora.

- 4.3 Colocar as amostras no imã e remover o sobrenadante

5. Preparação de lisado celular.

- 5.1 Adicionar 100  $\mu$ L de tampão de lise nas contas ligadas com células.

25                   5.2 Vortexar e colocar no gelo por 20'; vortexar intermitentemente.

- 5.3 Centrifugar por 15' em velocidade máxima a 4 graus.

---

5.4 Transferir o sobrenadante para um tubo eppendorf para correr o microarranjo, por exemplo, realizando o imunoensaio mediado por proximidade aqui descrito.

A figura 24 ilustra que BCR-ABL fosforilada pode ser detectada e medida em lisados celulares preparados a partir de células K562, isoladas de sangue usando contas magnéticas anti-CD45. Em particular, o anticorpo 4G10 (Millipore), que se liga ao resíduo fosfo-tirosina na porção Abl da proteína de fusão, foi usado para detectar os níveis de BCR-ABL fosforilada. Um ensaio similar pode ser realizado em lisados celulares preparados a partir de células brancas do sangue (por exemplo, células de leucemia mielogênica crônica (CML)), isoladas das amostras de sangue de paciente, usando contas magnéticas anti-CD45 e/ou anti-CD15 para detectar e medir a presença e/ou nível de BCR-ABL fosforilada.

**Exemplo 10. Detecção tanto dos níveis totais de proteína de fusão oncogênica quanto dos níveis totais de proteína de tamanho total natural em amostras de paciente.**

Este exemplo demonstra um método para a detecção simultânea da quantidade total e/ou estado de ativação de uma proteína de fusão oncogênica, em combinação com uma ou ambas as proteínas de tamanho total naturais que contêm sequências ou domínios encontrados na proteína de fusão oncogênica. Em uma modalidade particular, o presente método possibilita a detecção e/ou medição tanto dos níveis totais de BCR-ABL quanto dos níveis totais de BCR e/ou ABL de tamanho total natural em uma amostra biológica, tal como uma amostra de sangue ou aspirado de medula óssea.

Em certas modalidades, os níveis de proteína natural (por exemplo, níveis de BCR e/ou ABL de tamanho total) são determinados junto com os níveis de proteína de fusão oncogênica (por exemplo, níveis de BCR-ABL), de uma maneira realizada em multiplex em uma mesma peça. Nestas

---

modalidades, a proteína de tamanho total natural pode ser isolada vantajosamente junto com proteína de fusão oncogênica, de maneira tal que os níveis destas moléculas sejam determinados na mesma peça.

5 A figura 25 ilustra que os níveis totais de BCR-ABL não foram alterados quando um anticorpo direcionado para as terminações C de BCR de tamanho total natural (cujo domínio C-terminal não está presente em BCR-ABL) foi indicado na mesma lâmina da mesma peça, como um anticorpo direcionado para a região N-terminal de BCR-ABL. A figura 26 ilustra que o sinal de BCR livre natural, detectado com um anticorpo BCR  
10 específico para a terminação N, foi reduzido quando um anticorpo direcionado para a terminação C de BCR natural foi identificado na mesma lâmina da mesma peça.

Em modalidades particulares, o método descrito neste exemplo pode ser usado para detectar e/ou medir níveis totais de BCR-ABL, bem  
15 como níveis totais de BCR ou ABL de tamanho total natural, e uma razão dos níveis totais de BCR-ABL para os níveis de BCR ou ABL de tamanho total natural pode ser calculada. Em alguns exemplos, a razão de níveis de BCR-ABL para os níveis de BCR ou ABL de tamanho total natural é calculada para fornecer uma determinação mais exata de indicadores de resposta tais como,  
20 por exemplo, uma resposta molecular principal, uma resposta molecular completa, uma resposta citogenética completa e combinações destas. Em outros exemplos, o método descrito neste exemplo pode ser usado para monitorar mudanças na expressão de BCR-ABL, com relação a um controle, tal como BCR ou ABL de tamanho total natural (por exemplo, calculando  
25 uma razão dos níveis de BCR-ABL totais para os níveis de BCR ou ABL de tamanho total natural) como uma função de terapia (por exemplo, terapia de inibidor de tirosina quinase).

Todas as publicações e pedidos de patente citados nesta especificação são aqui incorporados pela referência, como se cada publicação

---

ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado pela referência. Embora a invenção precedente tenha sido descrita em alguns detalhes a título de ilustração e exemplo com propósitos de esclarecer o entendimento, será facilmente evidente aos versados na técnica, à luz dos preceitos desta invenção, que certas mudanças e modificações podem ser realizadas aqui sem fugir do espírito ou escopo das reivindicações em anexo.

---

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar o nível ou estado de ativação de uma proteína de fusão oncogênica, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) colocar um extrato celular em contato com uma primeira fração de ligação específica para um primeiro domínio de uma primeira proteína de tamanho total, em condições adequadas para transformar a primeira proteína de tamanho total presente no extrato celular em um complexo que compreende a primeira proteína de tamanho total e a primeira fração de ligação, em que o primeiro domínio da primeira proteína de tamanho total não apresenta uma proteína de fusão oncogênica correspondente, que compreende um segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total fundido a um primeiro domínio de uma segunda proteína de tamanho total diferente;

(b) remover o complexo da etapa (a) a partir do extrato celular para formar um extrato celular desprovido da primeira proteína de tamanho total;

(c) colocar o extrato celular da etapa (b) em contato com uma segunda, uma terceira e uma quarta fração de ligação que sob condições adequadas para transformar a proteína de fusão oncogênica presente no extrato celular em um complexo compreendendo a proteína de fusão oncogênica e a segunda, terceira e quarta fração de ligação;

em que a segunda fração de ligação é específica para o segundo domínio da primeira proteína de comprimento total diferente, em que a segunda fração de ligação é contida em um suporte sólido em um arranjo,

em que a terceira fração de ligação é etiquetada com uma fração de facilitação e é específica para um dos seguintes: (i) o primeiro domínio da segunda proteína de tamanho total diferente; (ii) o segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total; ou (iii) o sítio de fusão entre o segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total, e o primeiro domínio da segunda proteína de tamanho total diferente,

em que a quarta fração de ligação é marcada com um primeiro ele

mento de um par de amplificação de sinal, e é específica para o primeiro domínio da segunda proteína de tamanho total diferente, e

em que a fração de facilitação gera um agente de oxidação que canaliza e reage com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal;

5 (d) incubar o complexo da etapa (c) com um segundo elemento do par de amplificação de sinal para gerar um sinal amplificado; e

(e) detectar o sinal amplificado gerado a partir do primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal, através da determinação dos níveis ou do estado de ativação da proteína de fusão oncogênica.

10 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o extrato celular compreende um extrato de células isoladas de uma amostra opcionalmente selecionado de sangue total, soro, plasma, urina, escarro, fluido do lavado brônquico, lágrimas, aspirado de mama, linfa, saliva, aspirado por agulha fina (FNA) e combinações dos mesmos.

15 3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a amostra é obtida a partir de um paciente com câncer, opcionalmente causado pela formação de uma proteína de fusão concogênica devido a translocação do cromossomo na célula de câncer, o dito câncer opcionalmente sendo uma malignidade hematológica, sarcoma osteogênico, ou sarcoma de tecido mole, adita malignidade  
20 de hematológica sendo uma leucemia ou linfoma, leucemia mielogênica crônica (C-ML).

4. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que as células isoladas são selecionadas do grupo que consiste em células tumorais circulantes, leucócitos e combinações dos mesmos, ou em que as células  
25 isoladas são estimuladas *in vitro* com fatores de crescimento, ou em que as células isoladas são incubadas com um medicamento anti-câncer antes da estimulação com fator de crescimento, ou em que as células isoladas são lisadas após o estímulo com fator de crescimento para produzir o extrato celular, ou em que as células isoladas não são lavadas antes da lise para produzir o extrato celular.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão oncogênica é selecionada do grupo que consiste em BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RAR $\alpha$ -PML, IREL-URG, CBF $\beta$ -MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-C $\alpha$ 1, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG, TPR-MET e combinações dos mesmos.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão oncogênica é BCR-ABL.

7 Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a primeira proteína de tamanho total é BCR, em que o primeiro domínio da primeira proteína de tamanho total compreende a região carboxila-terminal de BCR (BCR-C), em que o segundo domínio diferente da primeira proteína de tamanho total compreende a região amino-terminal de BCR (BCR-N), em que a segunda proteína de tamanho total diferente é ABL, em que o primeiro domínio da segunda proteína de tamanho total diferente compreende a região carboxila-terminal de ABL (ABL-C), em que a primeira proteína de tamanho total é ABL, em que a segunda proteína de tamanho total diferente é BCR.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o estado de ativação é selecionado do grupo que consiste em um estado de fosforilação, estado de ubiquitinação, estado de complexação e combinações dos mesmos, ou ainda compreende determinar adicionalmente o nível ou estado de ativação de uma ou mais moléculas de transdução de sinal, em que a dita uma ou mais moléculas de transdução de sinal é um substrato de BCR-ABL, em que o dito substrato de BCR-ABL é selecionado do grupo que consiste em CRKL, JAK2, STAT5, VAV, BAP-1 e combinações dos mesmos.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a primeira fração de ligação compreende um primeiro anticorpo, o dito primeiro anticorpo é afixado a um suporte sólido, em que o suporte

sólido é selecionado do grupo que consiste em vidro, plástico, chipes, pinos, filtros, contas, papel, membrana, feixes de fibras e combinações dos mesmos.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a segunda fração de ligação compreende um segundo anticorpo, o dito segundo anticorpo é afixado a um suporte sólido, em que o suporte sólido é selecionado do grupo que consiste em vidro, plástico, chipes, pinos, filtros, contas, papel, membrana, feixes de fibras e combinações dos mesmos.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que as etapas (c) e (e) compreendem um ensaio imuno-absorvente ligado e enzima (ELISA), um ensaio de citometria de fluxo, ou um ensaio de seleção de rótulo, o dito ELISA opcionalmente compreende um ELISA em sanduíche, a dita citometria de fluxo opcionalmente compreende um ensaio de separação de células ativado por fluorescência (FACS).

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o extrato celular da etapa (b) é colocado em contato com uma diluição em série da segunda fração de ligação para formar uma pluralidade de complexos compreendendo a proteína de fusão oncogênica e a segunda fração de ligação, em que a dita terceira e a quarta fração de ligação compreendem os terceiros e quartos anticorpos, respectivamente, em que o terceiro e quarto anticorpos são ambos os anticorpos independentes do estado de ativação em que o sinal amplificado, gerado a partir do primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal, está correlacionado com a quantidade total da proteína de fusão oncogênica.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o terceiro anticorpo é um anticorpo independente do estado de ativação e o quarto anticorpo é um anticorpo dependente do estado de ativação, ou em que o sinal amplificado, gerado a partir do primeiro e segundo elementos do par de amplificação de sinal, está correlacionado com a quantidade de proteína de fusão oncogênica ativada.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

13, caracterizado pelo fato de que a terceira fração de ligação é marcada diretamente com a fração de facilitação, ou em que a quarta fração de ligação é marcada diretamente com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal, ou em que a quarta fração de ligação é marcada com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal, por meio da ligação entre um primeiro elemento de um par de ligação conjugado com o segundo anticorpo de detecção, e um segundo elemento do par de ligação conjugado com o primeiro elemento do par de amplificação de sinal.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente:

10 (f) colocar o extrato celular em contato com uma quinta fração de ligação específica para um segundo domínio da segunda proteína de tamanho total diferente, em condições adequadas para transformar a segunda proteína de tamanho total diferente presente no extrato celular em um complexo que compreende a segunda proteína de tamanho total diferente e a quinta fração de ligação, em que o segundo  
15 domínio da segunda proteína de tamanho total diferente não apresenta a proteína de fusão oncogênica; e

(g) remover o complexo da etapa (f) do extrato celular para formar um extrato celular desprovido da segunda proteína de tamanho total diferente, em que a etapa (f) é realizada antes, durante, ou após a etapa (a).

20 16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido é selecionado do grupo que consiste em vidro, plástico, chips, pinos, filtros, contas, papel, membrana, feixes de fibras e combinações dos mesmos.

25 17. Método para otimizar terapia e/ou reduzir a toxicidade em um sujeito tendo câncer e recebendo um curso de terapia para o tratamento de câncer, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) isolar células de câncer após a administração de um medicamento anti-câncer;

(b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;

(c) medir um nível de expressão e/ou ativação de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17;

(d) comparar o nível medido de expressão e/ou ativação da proteína de fusão oncogênica com um nível de expressão e/ou ativação da proteína de fusão oncogênica, medido em um momento anterior, durante o período da terapia; e

(e) determinar uma dose subsequente do período da terapia para o sujeito, ou se um período da terapia diferente pode ser administrado ao sujeito com base na comparação da etapa (d).

10                    18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão oncogênica é BCR-ABL, em que o sujeito é determinado por apresentar células de câncer que expressam a proteína de fusão oncogênica antes de receber o período da terapia, em que o sujeito é positivo para BCR-ABL.

15                    19. Método, de acordo a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que tanto o nível de expressão quanto o nível de ativação da proteína de fusão oncogênica são medidos no extrato celular, em que a etapa (c) compreende adicionalmente calcular uma razão dos níveis de proteína ativada para proteína de fusão oncogênica total, em que a etapa (d) compreende comparar a razão calculada dos níveis de proteína ativada para proteína de fusão oncogênica total com uma razão dos  
20                    níveis de proteína ativada para proteína de fusão oncogênica total, calculada para o sujeito em um estágio inicial.

25                    20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a razão calculada dos níveis de proteína ativada para proteína de fusão oncogênica total está correlacionada com a inibição percentual da proteína de fusão oncogênica ativada, mediante tratamento com medicamento anti-câncer, em que a razão calculada dos níveis de proteína ativada para proteína de fusão oncogênica total está relacionada com o nível de uma proteína controle em que a razão calculada dos níveis de proteína ativada para proteína de fusão oncogênica total compreende uma razão dos níveis de proteína BCR-ABL fosfo/total.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a proteína controle compreende uma proteína natural de tamanho total que contém sequências ou domínios encontrados na proteína de fusão oncogênica em que a proteína controle é selecionada do grupo que consiste em BCR de tamanho total, ABL de tamanho total e combinações dos mesmos.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 21, caracterizado pelo fato de que menos de cerca de 50 % de inibição do nível de ativação da proteína de fusão oncogênica indica uma necessidade para aumentar a dose subsequente do período da terapia, ou para administrar um período da terapia diferente, em que menos de cerca de 50 % de inibição do nível de ativação da proteína de fusão oncogênica indica uma falta de concordância do sujeito ao período da terapia, a existência de possíveis efeitos colaterais ou toxicidade associada com o período da terapia, ou combinações dos mesmos, em que mais de cerca de 80 % de inibição do nível de ativação da proteína de fusão oncogênica indica que o sujeito está no período da terapia correto e na dose correta.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 22, caracterizado pelo fato de que o câncer é leucemia mielogênica crônica (CML), em que o medicamento anti-câncer é selecionado do grupo que consiste em um anticorpo monoclonal, inibidor de tirosina quinase, agente quimioterapêutico, agente terapêutico hormonal, agente radioterapêutico, vacina e combinações dos mesmos, em que o inibidor de tirosina quinase é selecionado do grupo que consiste em mesilato de imatinib (Gleevec<sup>®</sup>), nilotinib (Tasigna<sup>®</sup>), dasatinib (Sprycel<sup>®</sup>), bosutinib (SKI-606) e combinações dos mesmos.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 23, caracterizado pelo fato de que as etapas (c) a (e) compreendem alternativamente:

(c') medir um nível de expressão e/ou ativação de uma proteína de fusão oncogênica e uma ou mais moléculas de transdução de sinal em sua via no extrato celular;

(d') comparar o nível medido de expressão e/ou ativação da proteí-

na de fusão oncogênica, e moléculas de transdução de sinal, com um nível de expressão e/ou ativação da proteína de fusão oncogênica, e moléculas de transdução de sinal, medido em um momento inicial durante o período da terapia; e

- (e') determinar uma dose subsequente do período da terapia para o  
5 sujeito, ou se um período da terapia diferente pode ser administrado ao sujeito com base na comparação da etapa (d').

25. Método para selecionar um medicamento anti-câncer adequado para o tratamento de um câncer, ou para identificar a resposta de um câncer ao tratamento com um medicamento anti-câncer, ou para prever a resposta de um sujeito  
10 tendo câncer ao tratamento com um medicamento anti-câncer, ou para determinar se um sujeito tendo câncer é resistente ao tratamento com um medicamento anti-câncer, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

- (a) isolar células de um câncer após a administração de um medicamento anti-câncer, ou antes da incubação com um medicamento anti-câncer;  
15 (b) lisar as células isoladas para produzir um extrato celular;  
(c) medir um nível de expressão e/ou ativação de uma proteína de fusão oncogênica no extrato celular, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 24; e  
(d) determinar se o medicamento anti-câncer é adequado ou inade-  
20 quado para o tratamento do câncer, comparando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um nível de referência e/ou perfil de ativação gerado na ausência do medicamento anti-câncer, identificar o câncer como responsivo ou não responsivo ao tratamento com o medicamento anti-câncer, comparando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão  
25 oncogênica com um nível de referência e/ou perfil de ativação gerado na ausência do medicamento anti-câncer, e/ou prever a qual probabilidade que o sujeito responderá ao tratamento com o medicamento anti-câncer, comparando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um nível de referência e/ou perfil de ativação gerado na ausência do medicamento anti-câncer, e/ou

determinar se o sujeito é resistente ou sensível ao tratamento com o medicamento anti-câncer, comparando o nível de expressão e/ou ativação detectado para a proteína de fusão oncogênica com um nível de referência e/ou perfil de ativação gerado na ausência do medicamento anti-câncer ou na presença do medicamento anti-câncer em um período inicial, respectivamente.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o câncer é leucemia mielogênica crônica (CML) em que o medicamento anti-câncer é selecionado do grupo que consiste em um anticorpo monoclonal, inibidor de tirosina quinase, agente quimioterapêutico, agente terapêutico hormonal, agente radioterapêutico, vacina e combinações dos mesmos, em que o anticorpo monoclonal é selecionado do grupo que consiste em trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>), alemtuzumab (Campath<sup>®</sup>), bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>), cetuximab (Erbix<sup>®</sup>), gemtuzumab (Mylotarg<sup>®</sup>), panitumumab (Vectibix<sup>™</sup>), rituximab (Rituxan<sup>®</sup>), tositumomab (BEX-XAR<sup>®</sup>) e combinações dos mesmos, o dito inibidor de tirosina quinase é selecionado do grupo que consiste em mesilato de imatinib (Gleevec<sup>®</sup>), nilotinib (Tasigna<sup>®</sup>), dasatinib (Sprycel<sup>®</sup>), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa<sup>®</sup>), sunitinib (Sutent<sup>®</sup>), erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>), lapatinib (Tykerb<sup>®</sup>), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), leflunomide (SU101), vandetanib (ZACTIMA<sup>™</sup>; ZD6474) e combinações dos mesmos, em que o agente quimioterapêutico é selecionado do grupo que consiste em pemetrexed (ALIMTA<sup>®</sup>), gencitabina (Gemzar<sup>®</sup>), sirolimus (rapamycin), análogos de rapamicina, compostos de platina, carboplatina, cisplatina, satraplatina, paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>), tensirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001) e combinações dos mesmos em que o agente terapêutico hormonal é selecionado do grupo que consiste em inibidores de aromatase, moduladores do receptor de estrogênio seletivo, esteróides, finasterida, agonistas do hormônio que libera gonadotropina, sais farmacologicamente aceitáveis destes, estereoisômeros destes, derivados destes, análogos destes e combinações dos mesmos, em que o agente radioterapêutico é selecionado do grupo que consiste em <sup>47</sup>Sc, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>89</sup>Sr, <sup>86</sup>Y, <sup>87</sup>Y, <sup>90</sup>Y, <sup>105</sup>Rh, <sup>111</sup>Ag, <sup>111</sup>In, <sup>117m</sup>Sn, <sup>149</sup>Pm,

$^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$  e combinações dos mesmos.

27. Invenção, caracterizada por quaisquer de suas concretizações ou categorias de reivindicação englobadas pela matéria inicialmente revelada no pedido de patente ou em seus exemplos aqui apresentados.

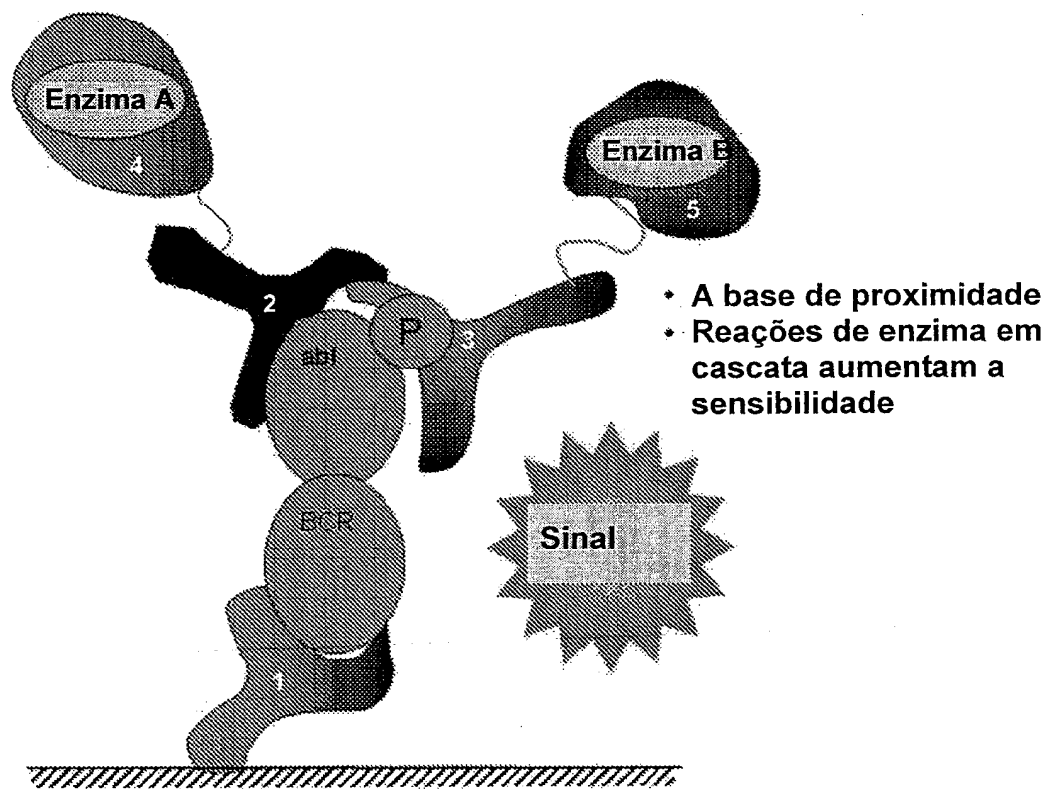


FIG. 1

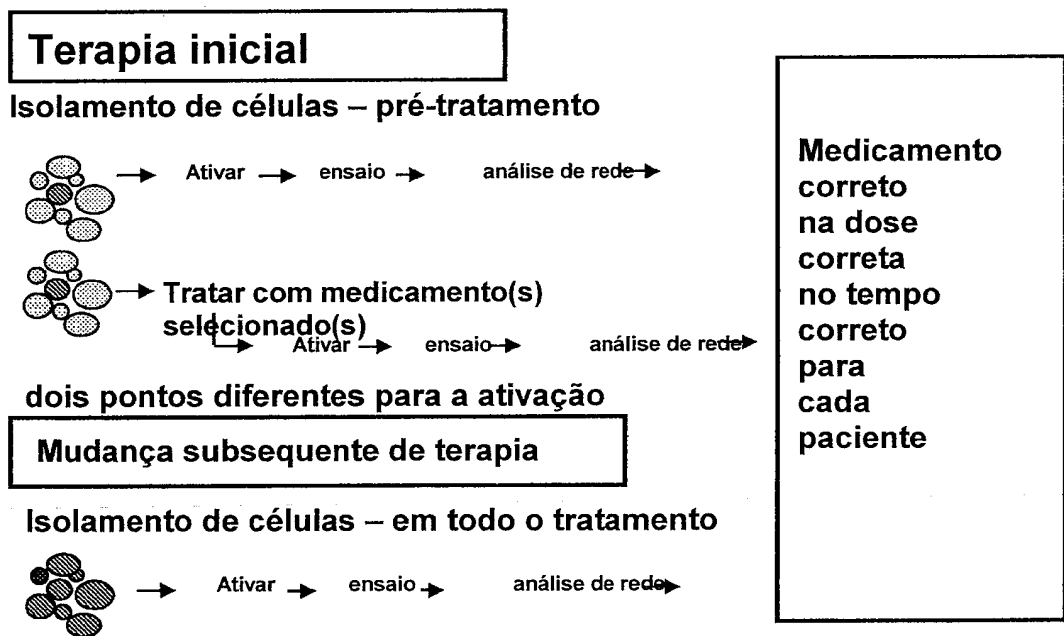


FIG. 2

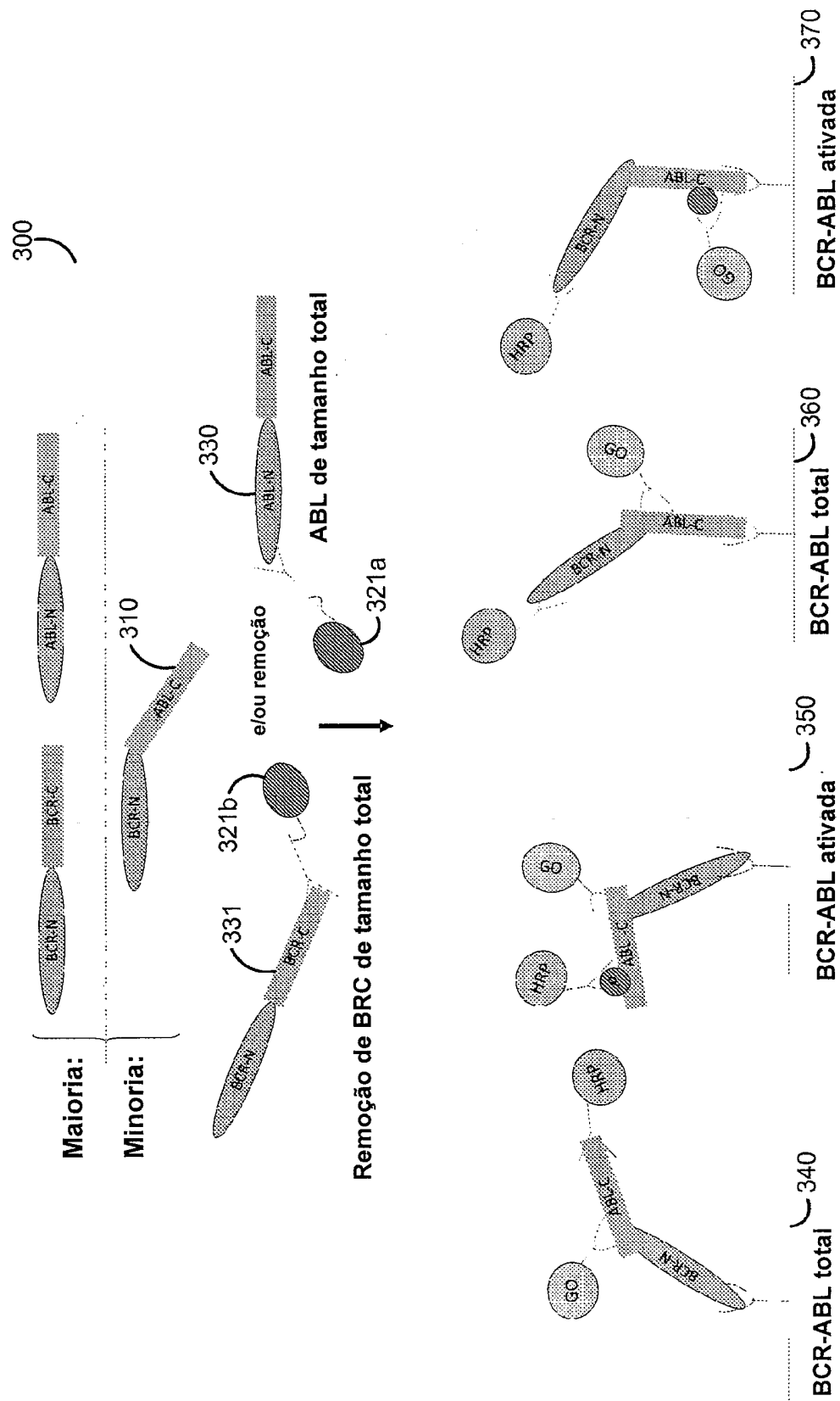


FIG. 3A

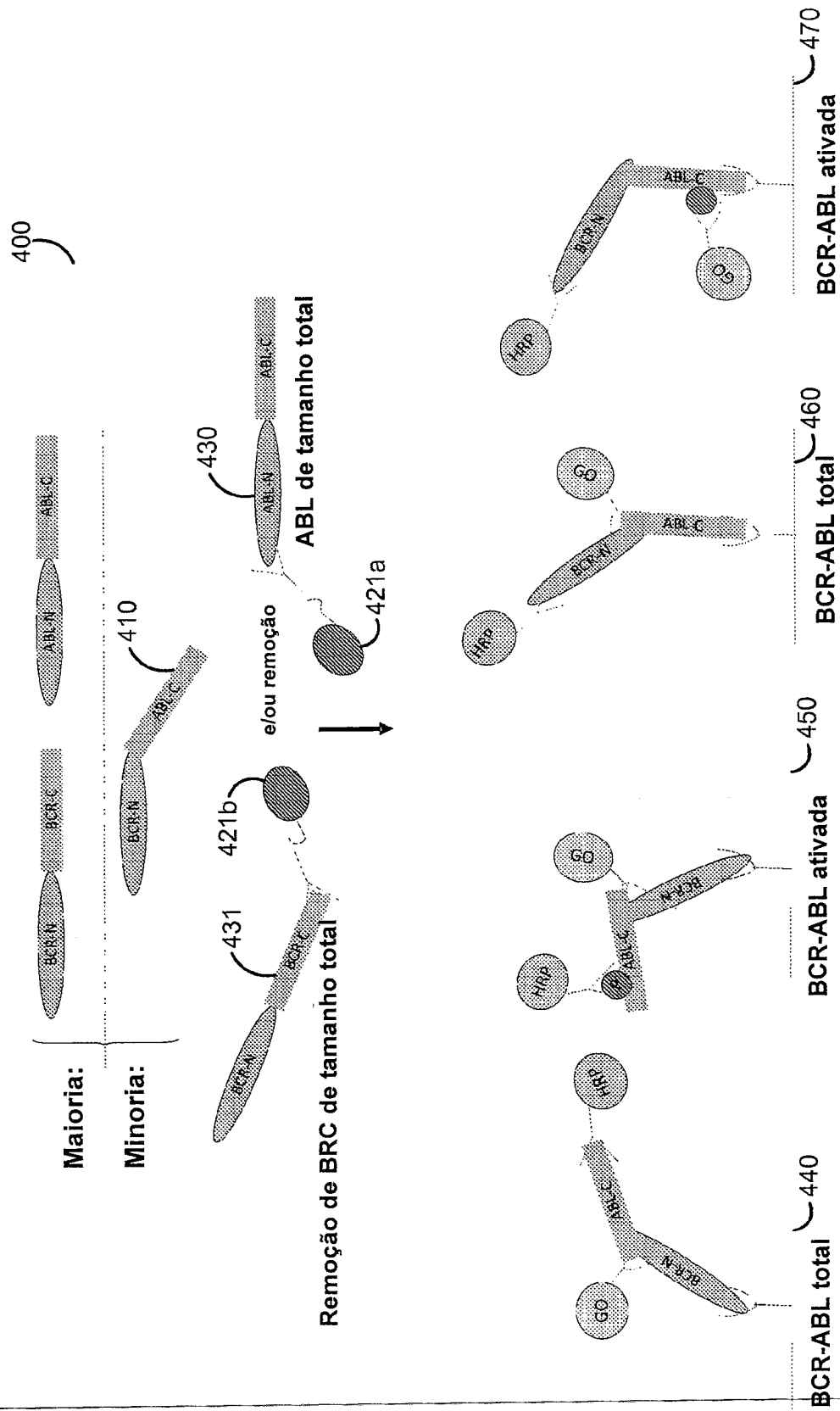


FIG. 3B

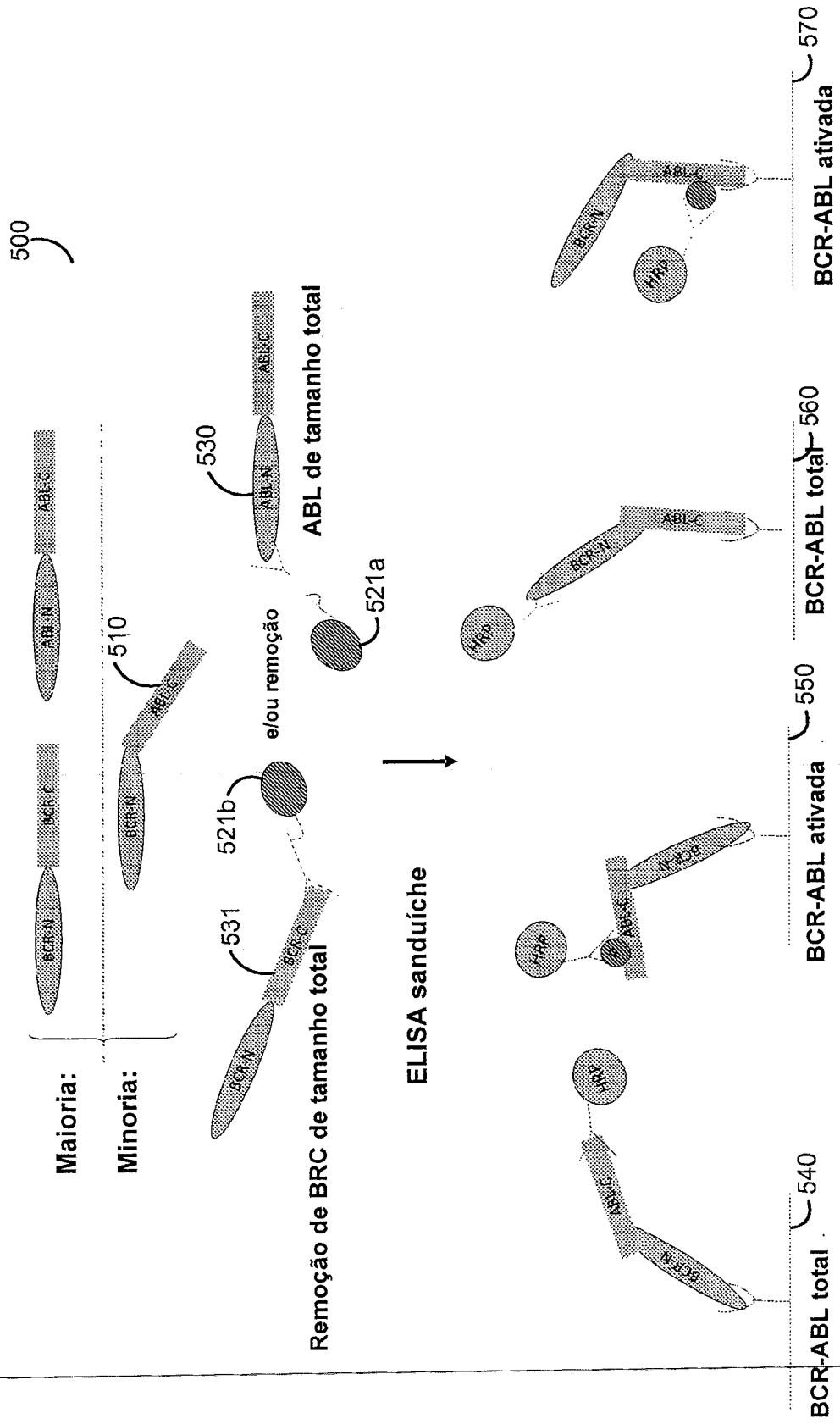


FIG. 3C

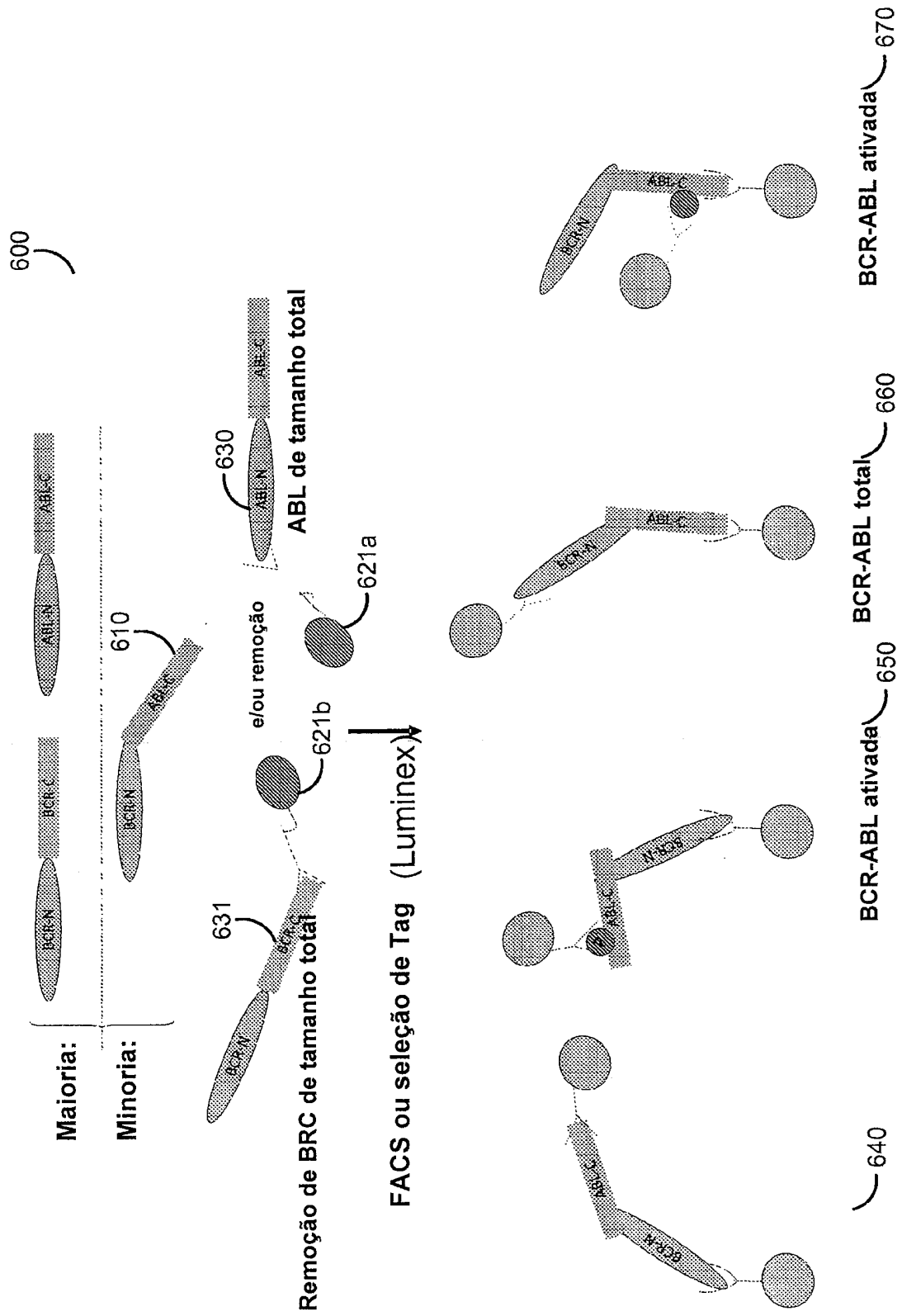
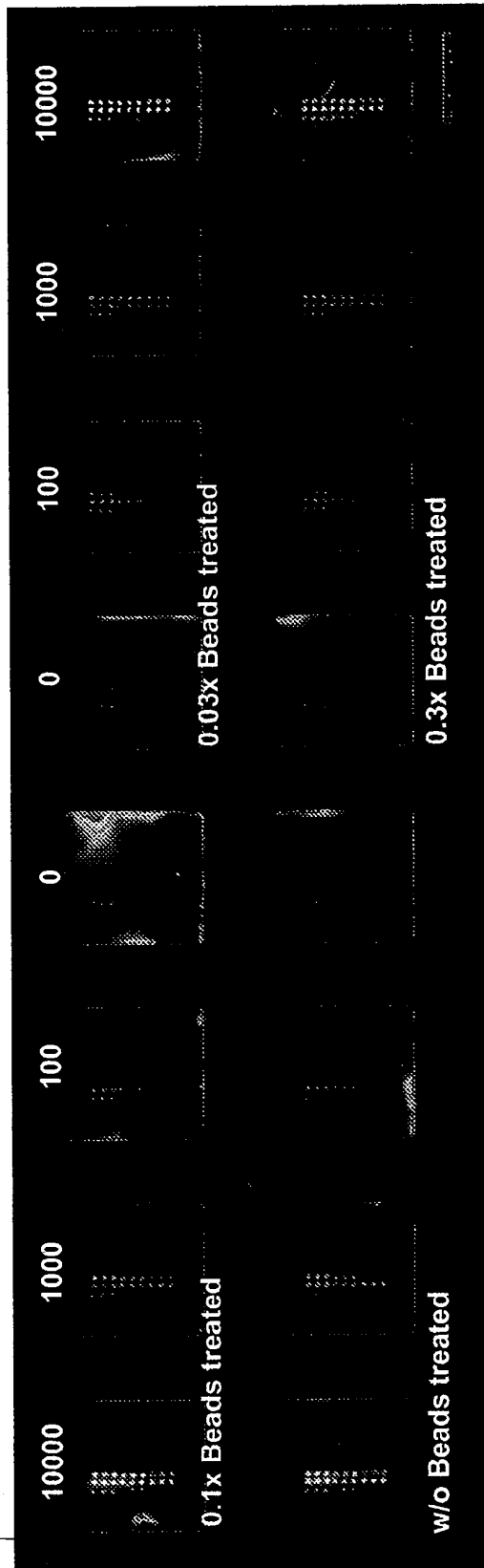
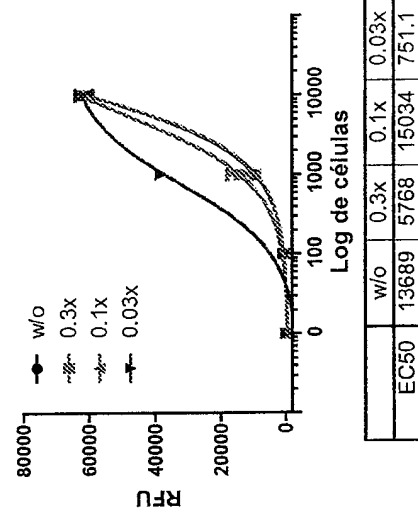


FIG. 3D

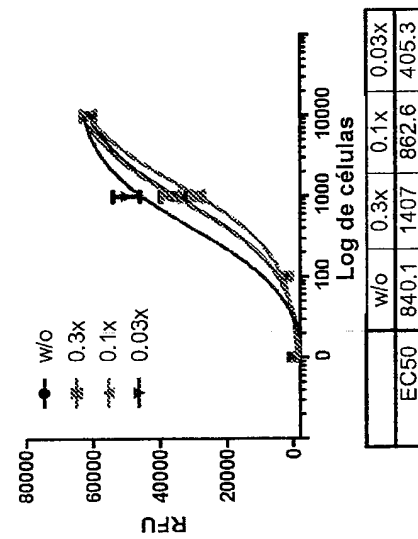


Captura: IgG, BCR Ab, ABL Ab; Detecção: ABL Ab-HRP

BCR C-terminal Ab/microesferas removem BCR livre em células K562 (0.25 mg/ml Captura)



BCR-ABL após a remoção de BCR livre em células K562 (0.5 mg/ml Captura)



BCR-ABL após a remoção de BCR livre em células K562 (1 mg/ml Captura)

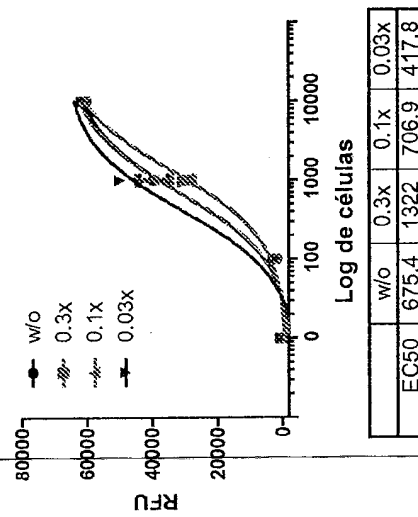
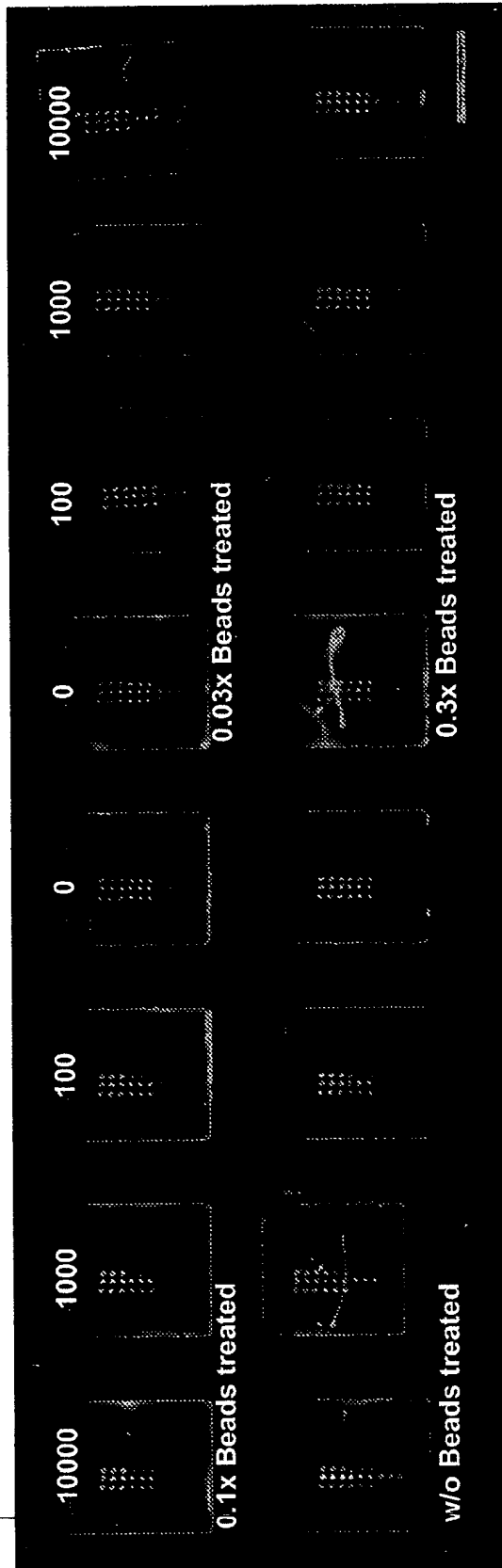
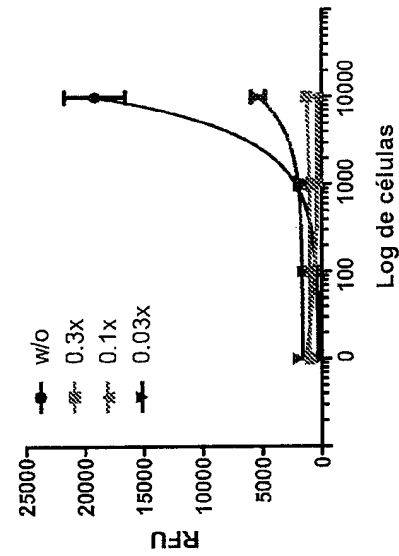


FIG. 4

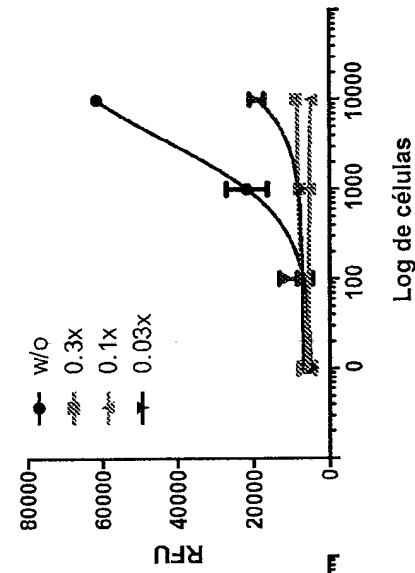


Captura: IgG, BCR Ab, ABL Ab; Detecção: Terminações C:BCR Ab-HRP

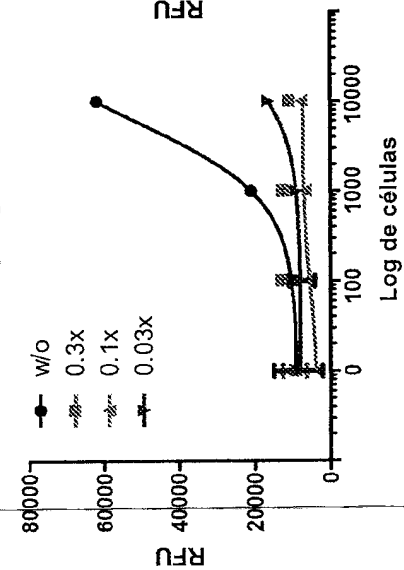
BCR C-terminal Ab/microesferas removem BCR livre em células K562 (0.25mg/ml Captura )



BCR C-terminal Ab/microesferas removem BCR livre em células K562 (0.5mg/ml Captura )



BCR C-terminal Ab/microesferas removem BCR livre em células K562 (1mg/ml Captura )



Log de células

FIG. 5

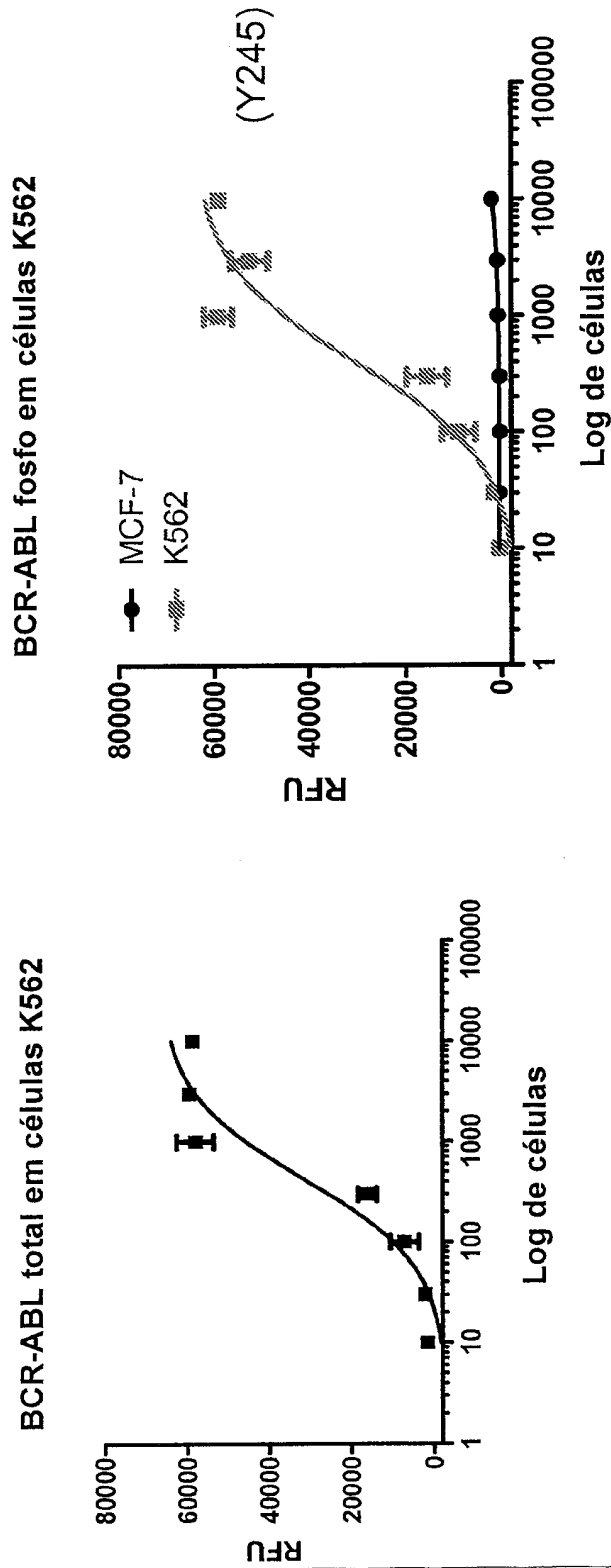


FIG. 6

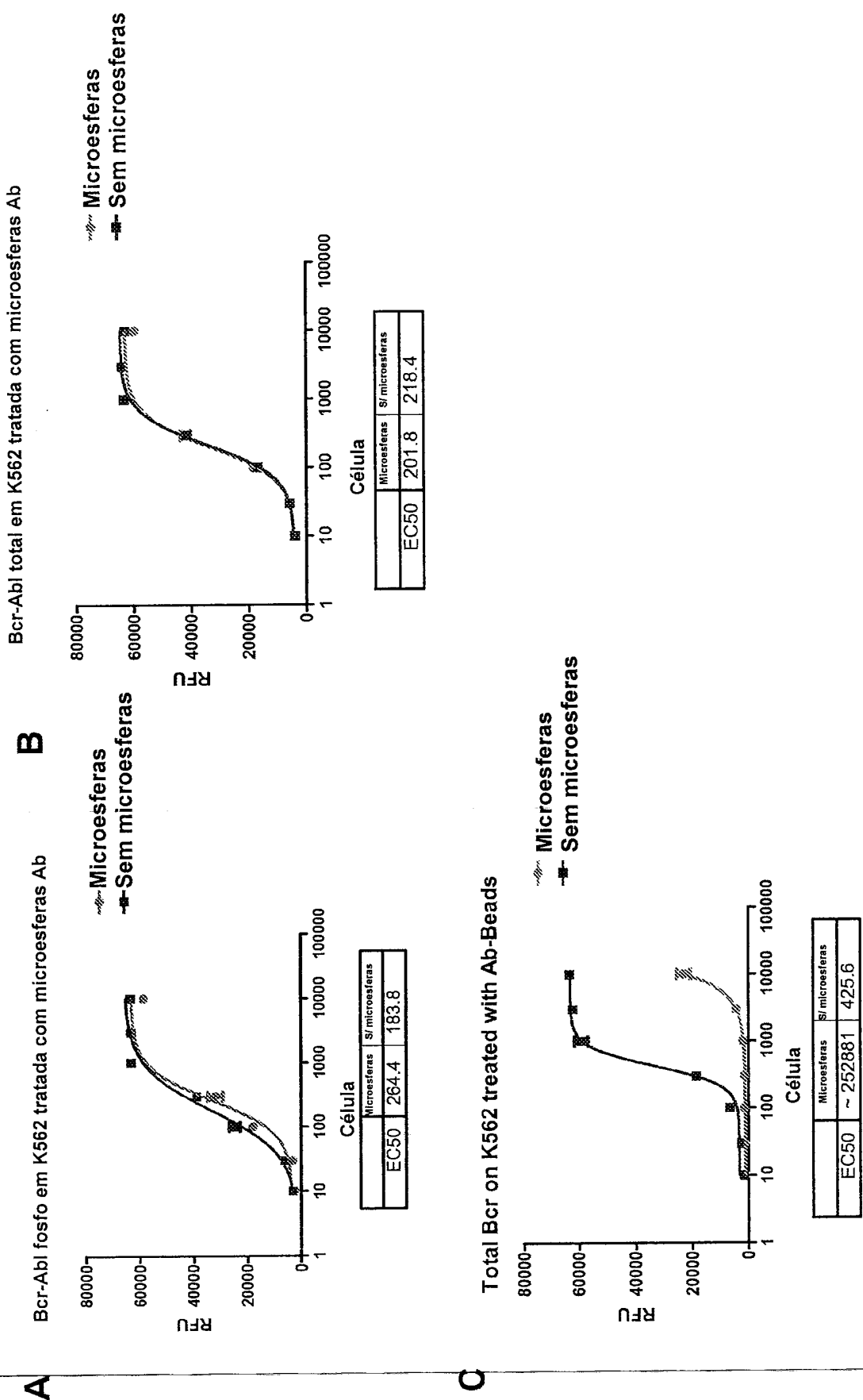


FIG. 7

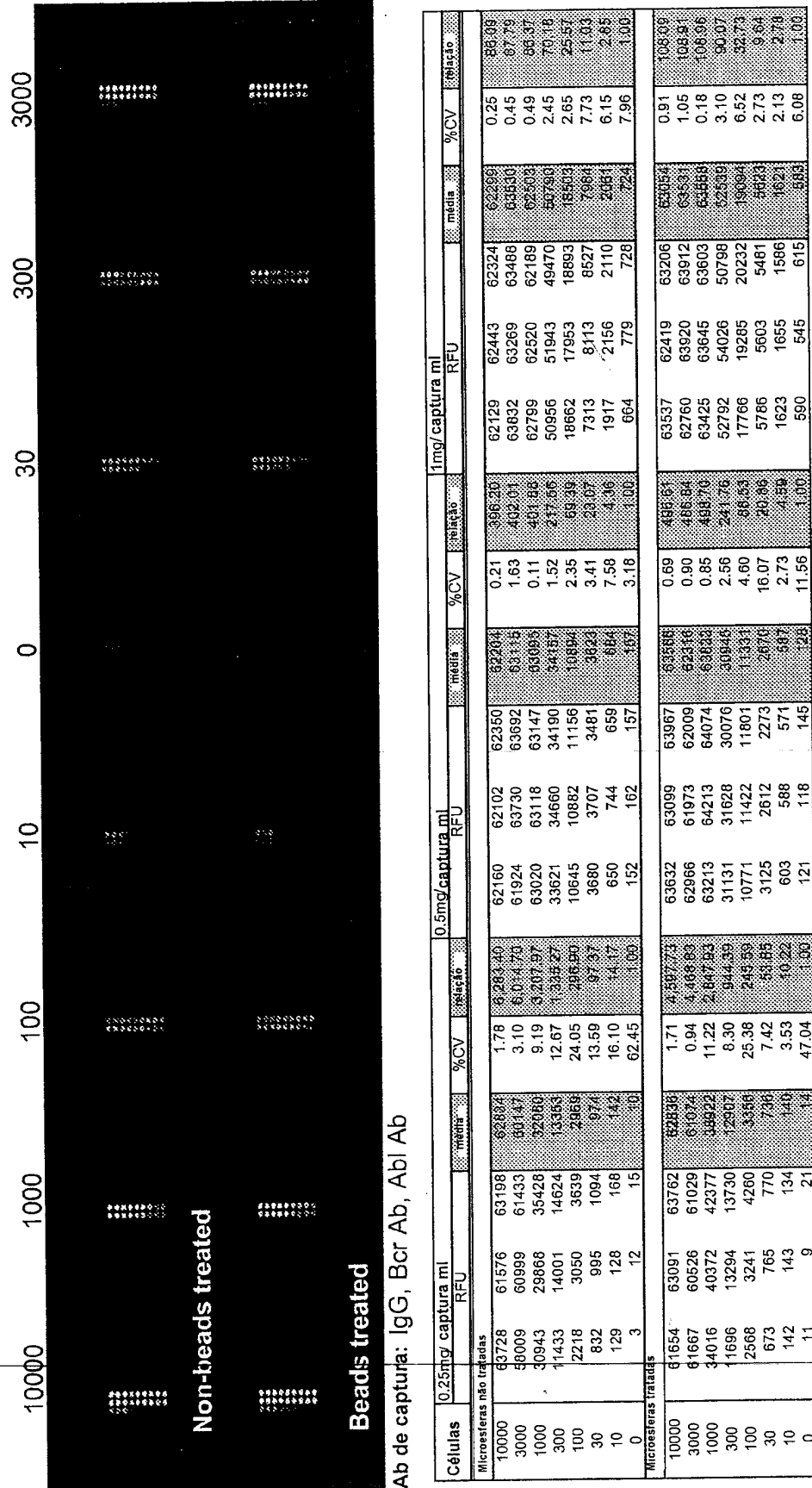
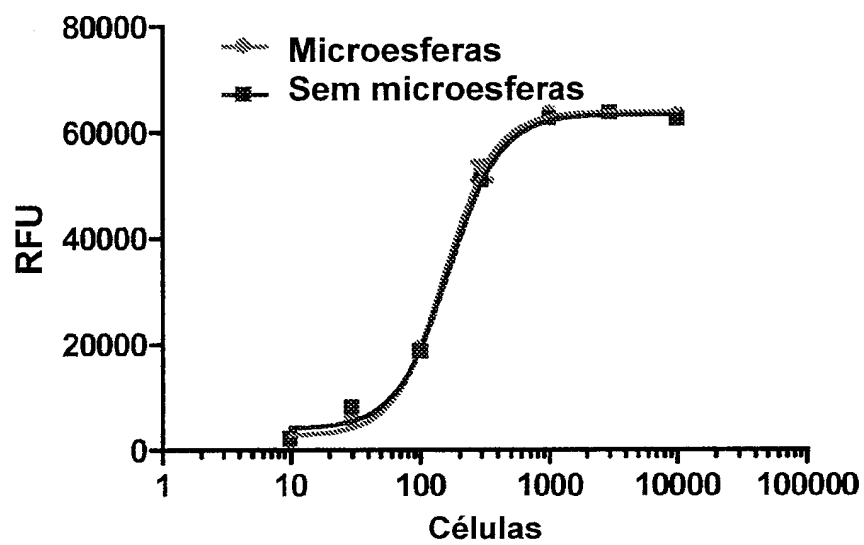
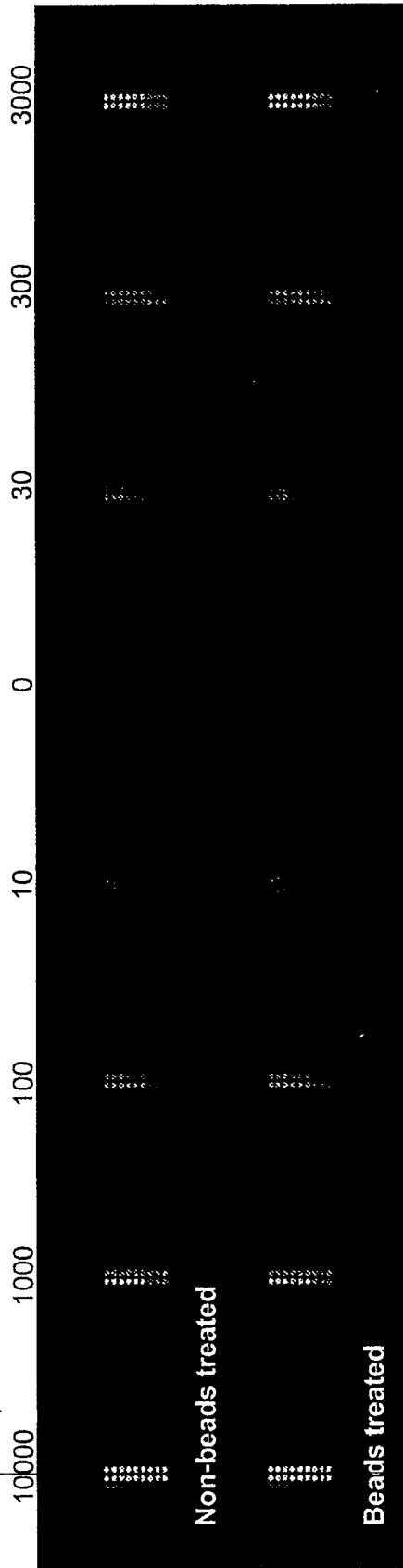


FIG. 8A



|      | Microesferas | S/ microesferas |
|------|--------------|-----------------|
| EC50 | 154.7        | 164.6           |

**FIG. 8B**



Ab de captura: IgG, Bcr Ab, AbI Ab

| Células                   | 0.25mg/captura ml |       |       |         | 0.5mg/captura ml |        |     |         | 1mg/captura ml |       |       |         |        |
|---------------------------|-------------------|-------|-------|---------|------------------|--------|-----|---------|----------------|-------|-------|---------|--------|
|                           | RFU               | média | %CV   | seleção | RFU              | média  | %CV | seleção | RFU            | média | %CV   | seleção |        |
| Microesferas não tratadas |                   |       |       |         |                  |        |     |         |                |       |       |         |        |
| 10000                     | 52712             | 63245 | 63795 | 83251   | 0.86             | 2.55   | 36  | 62476   | 64288          | 62470 | 83078 | 1.66    | 290.56 |
| 3000                      | 44350             | 47234 | 53984 | 48523   | 10.19            | 2.15   | 36  | 63657   | 63581          | 64476 | 83905 | 0.78    | 299.89 |
| 1000                      | 29486             | 34863 | 40542 | 34864   | 15.81            | 1.82   | 36  | 61901   | 62300          | 62267 | 82188 | 0.36    | 289.81 |
| 300                       | 4957              | 5695  | 7482  | 4038    | 21.32            | 296.48 |     | 18648   | 19880          | 20179 | 19599 | 4.15    | 93.86  |
| 100                       | 1473              | 1726  | 2299  | 1833    | 23.09            | 91.98  |     | 5463    | 5815           | 5955  | 5794  | 4.41    | 27.70  |
| 30                        | 369               | 571   | 654   | 531     | 27.59            | 26.16  |     | 2108    | 2358           | 2257  | 2241  | 5.61    | 10.80  |
| 10                        | 133               | 160   | 159   | 151     | 10.16            | 6.38   |     | 597     | 694            | 685   | 659   | 8.14    | 3.19   |
| 0                         | 28                | 25    | 25    | 26      | 6.66             | 1.90   |     | 197     | 226            | 215   | 213   | 6.88    | 1.00   |
| Microesferas tratadas     |                   |       |       |         |                  |        |     |         |                |       |       |         |        |
| 10000                     | 54162             | 62131 | 61803 | 63505   | 2.04             | 1.97   | 36  | 64177   | 62433          | 63150 | 83283 | 1.39    | 352.71 |
| 3000                      | 48914             | 57196 | 61182 | 55764   | 11.22            | 1.99   | 37  | 61628   | 64002          | 63826 | 83152 | 2.09    | 352.15 |
| 1000                      | 30779             | 33439 | 35875 | 33364   | 7.64             | 1.05   | 38  | 63441   | 62972          | 61217 | 82843 | 1.87    | 348.78 |
| 300                       | 4300              | 5334  | 6324  | 5319    | 19.03            | 167.98 |     | 15408   | 16127          | 17185 | 19240 | 5.50    | 90.56  |
| 100                       | 1746              | 2250  | 2383  | 2126    | 15.80            | 67.15  |     | 5528    | 5536           | 5520  | 5528  | 0.14    | 30.83  |
| 30                        | 433               | 542   | 596   | 524     | 15.86            | 13.54  |     | 1610    | 1710           | 1587  | 1838  | 4.00    | 9.12   |
| 10                        | 165               | 176   | 200   | 180     | 9.92             | 5.69   |     | 624     | 646            | 607   | 595   | 3.13    | 3.19   |
| 0                         | 16                | 24    | 55    | 32      | 65.05            | 1.88   |     | 172     | 173            | 193   | 179   | 6.61    | 1.90   |

FIG. 9A

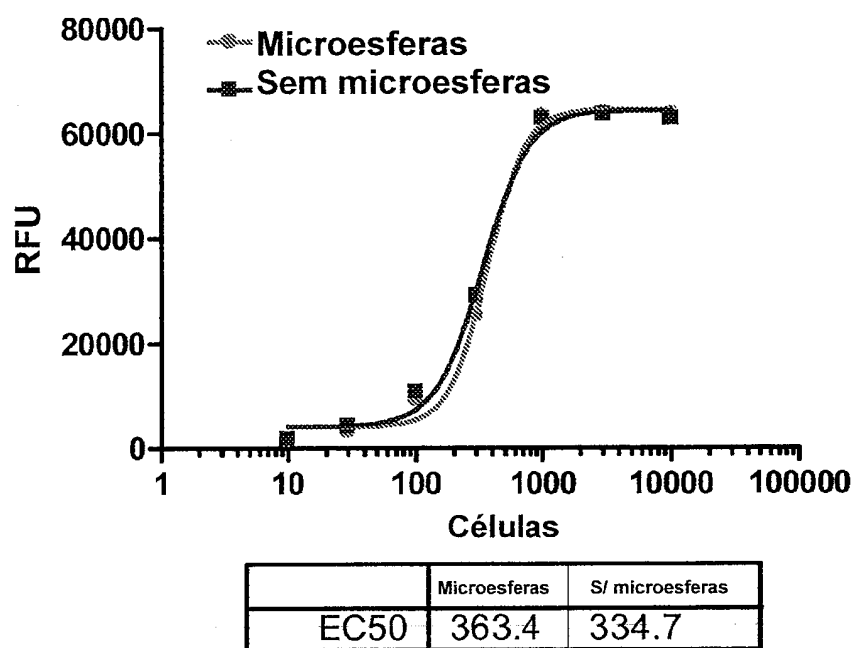
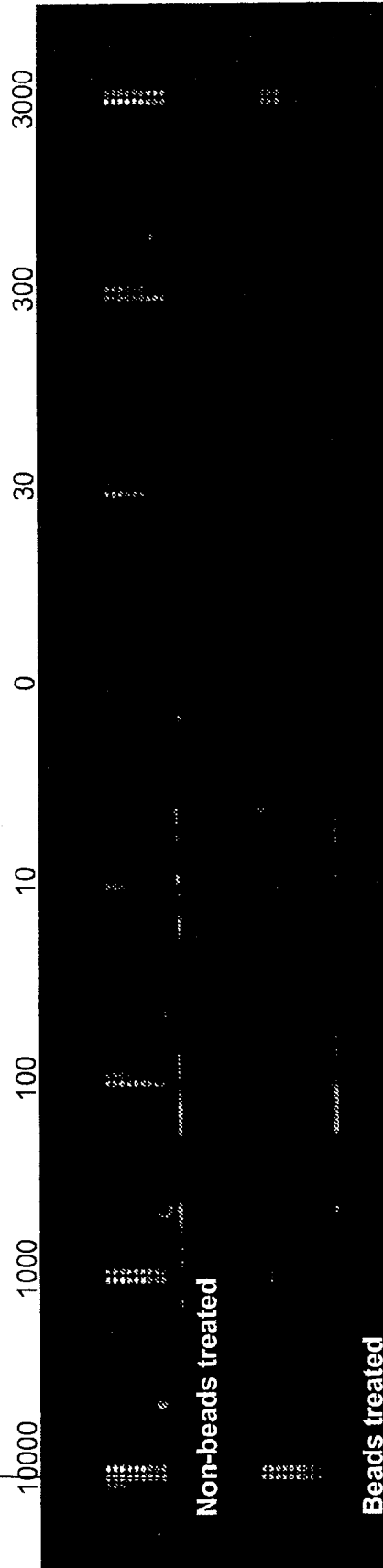


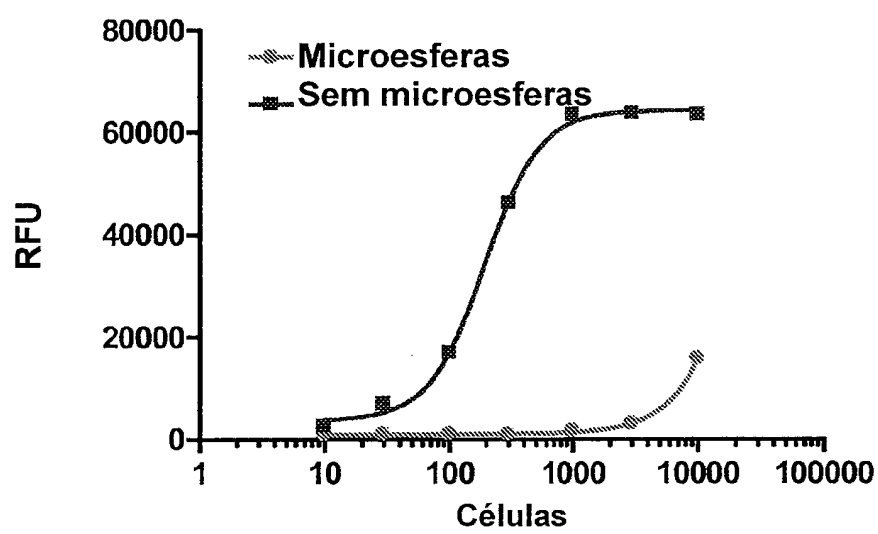
FIG. 9B



Ab de captura: IgG, Bcr Ab, Abl Ab

| Células                          | 0.25mg/captura ml |       |       |         | 0.5mg/captura ml |       |       |         | 1mg/captura ml |       |       |         |
|----------------------------------|-------------------|-------|-------|---------|------------------|-------|-------|---------|----------------|-------|-------|---------|
|                                  | RFU               | média | %CV   | relação | RFU              | média | %CV   | relação | RFU            | média | %CV   | relação |
| <b>Microesferas não tratadas</b> |                   |       |       |         |                  |       |       |         |                |       |       |         |
| 10000                            | 63733             | 61617 | 62036 | 52482   | 63676            | 63065 | 63338 | 63360   | 63487          | 63935 | 63384 | 7376    |
| 3000                             | 35414             | 53342 | 60690 | 48815   | 64030            | 63240 | 63800 | 63690   | 63432          | 63529 | 63551 | 0.21    |
| 1000                             | 31455             | 31604 | 38580 | 33880   | 63600            | 63427 | 64344 | 63790   | 63494          | 63054 | 63267 | 0.35    |
| 300                              | 4797              | 8354  | 11758 | 8303    | 29250            | 31388 | 29414 | 30017   | 45576          | 46622 | 46065 | 1.19    |
| 100                              | 2155              | 2480  | 3410  | 2675    | 9450             | 11465 | 10552 | 10499   | 15669          | 17304 | 16938 | 6.04    |
| 30                               | 471               | 855   | 1192  | 836     | 3382             | 3749  | 3248  | 3480    | 6426           | 7071  | 6046  | 5.35    |
| 10                               | 128               | 211   | 327   | 222     | 917              | 1080  | 916   | 971     | 2086           | 2544  | 2418  | 12.02   |
| 0                                | 7                 | 57    | 49    | 38      | 237              | 241   | 349   | 278     | 725            | 824   | 858   | 17.87   |
| <b>Microesferas tratadas</b>     |                   |       |       |         |                  |       |       |         |                |       |       |         |
| 10000                            | 1975              | 2642  | 3402  | 2673    | 9552             | 10045 | 10622 | 10073   | 15339          | 15550 | 15718 | 3.08    |
| 3000                             | 273               | 302   | 364   | 313     | 1482             | 1131  | 1364  | 1326    | 3102           | 2973  | 2989  | 2.33    |
| 1000                             | 142               | 172   | 210   | 175     | 612              | 586   | 604   | 601     | 1586           | 1733  | 1678  | 4.46    |
| 300                              | 24                | 71    | 99    | 66      | 304              | 322   | 381   | 334     | 840            | 894   | 1054  | 11.98   |
| 100                              | 91                | 72    | 85    | 73      | 289              | 301   | 304   | 288     | 967            | 1016  | 1045  | 3.91    |
| 30                               | 5                 | 75    | 74    | 51      | 301              | 322   | 270   | 296     | 999            | 952   | 931   | 3.62    |
| 10                               | 48                | 60    | 65    | 53      | 302              | 287   | 220   | 270     | 920            | 964   | 873   | 4.95    |
| 0                                | 40                | 54    | 61    | 52      | 217              | 238   | 296   | 251     | 735            | 830   | 781   | 6.31    |

FIG. 10A



|      |              |                 |
|------|--------------|-----------------|
|      | Microesferas | S/ microesferas |
| EC50 | ~ 635001     | 191.7           |

FIG. 10B

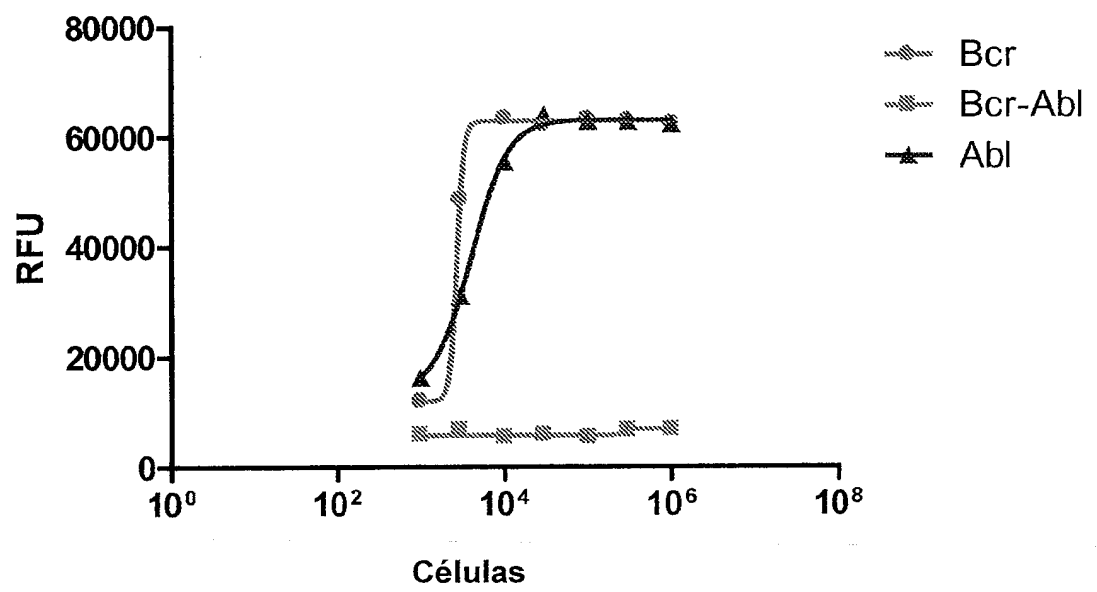


FIG. 11

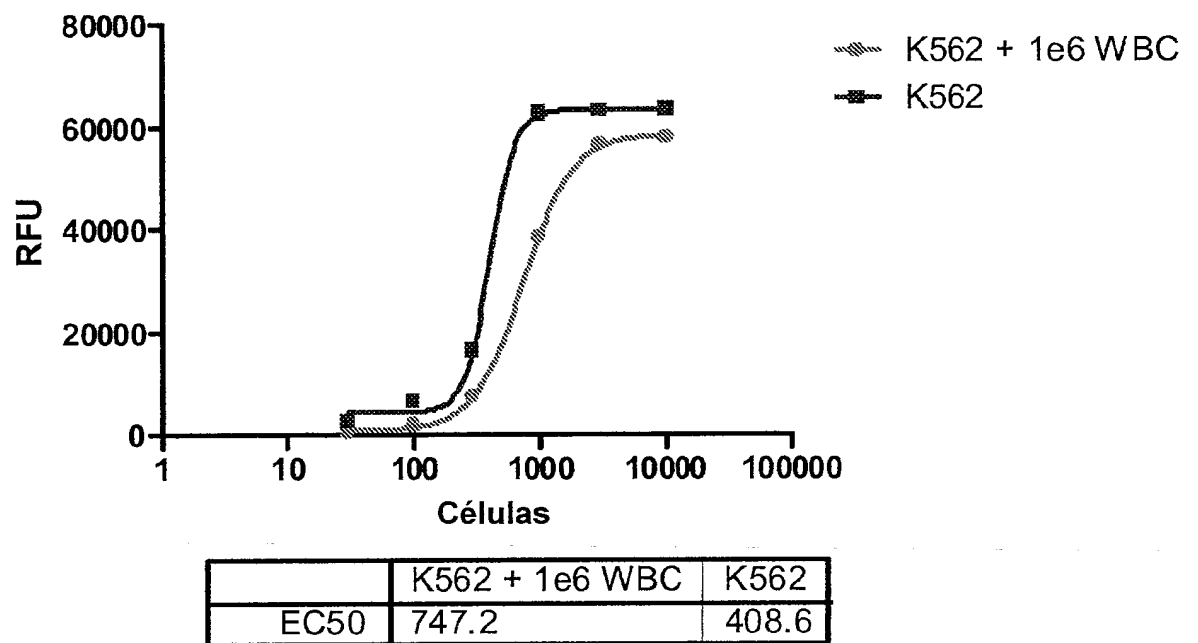
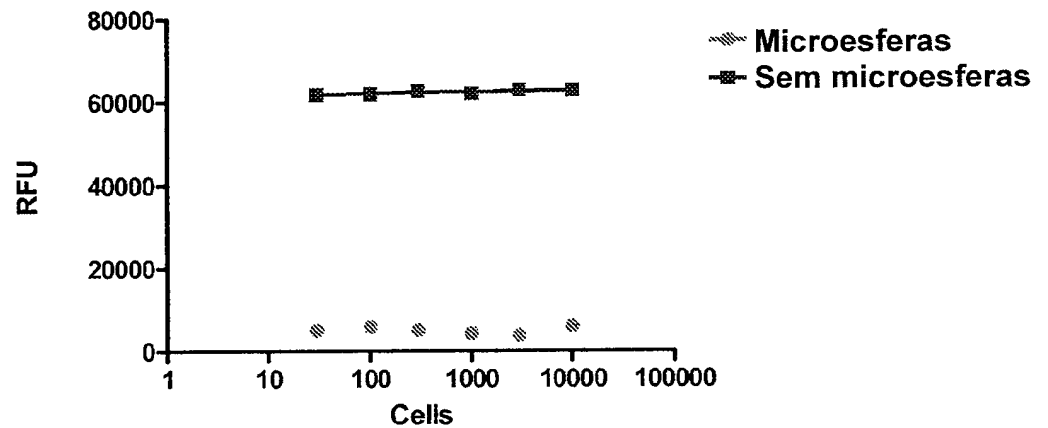


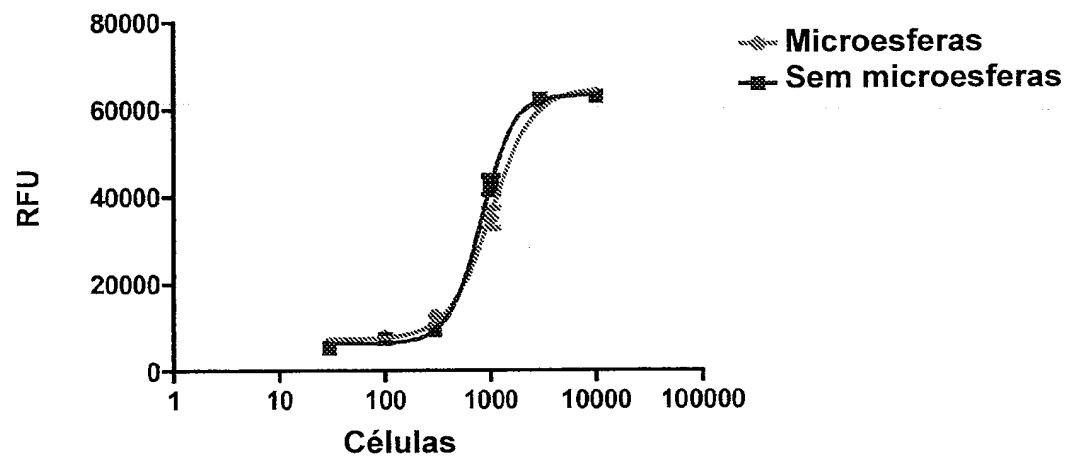
FIG. 12

**A**

Bcr total em K562 + 1e6 WBC tratada com microesferas – 1684  
( Captura Ab 0.25mg/ml)

**B**

Bcr-Abl total em K562 + 1e6 WBC tratada com microesferas – 1684  
( Captura Ab 1mg/ml)



|      | Microesferas | S/ microesferas |
|------|--------------|-----------------|
| EC50 | 1006         | 819.8           |

**FIG. 13**

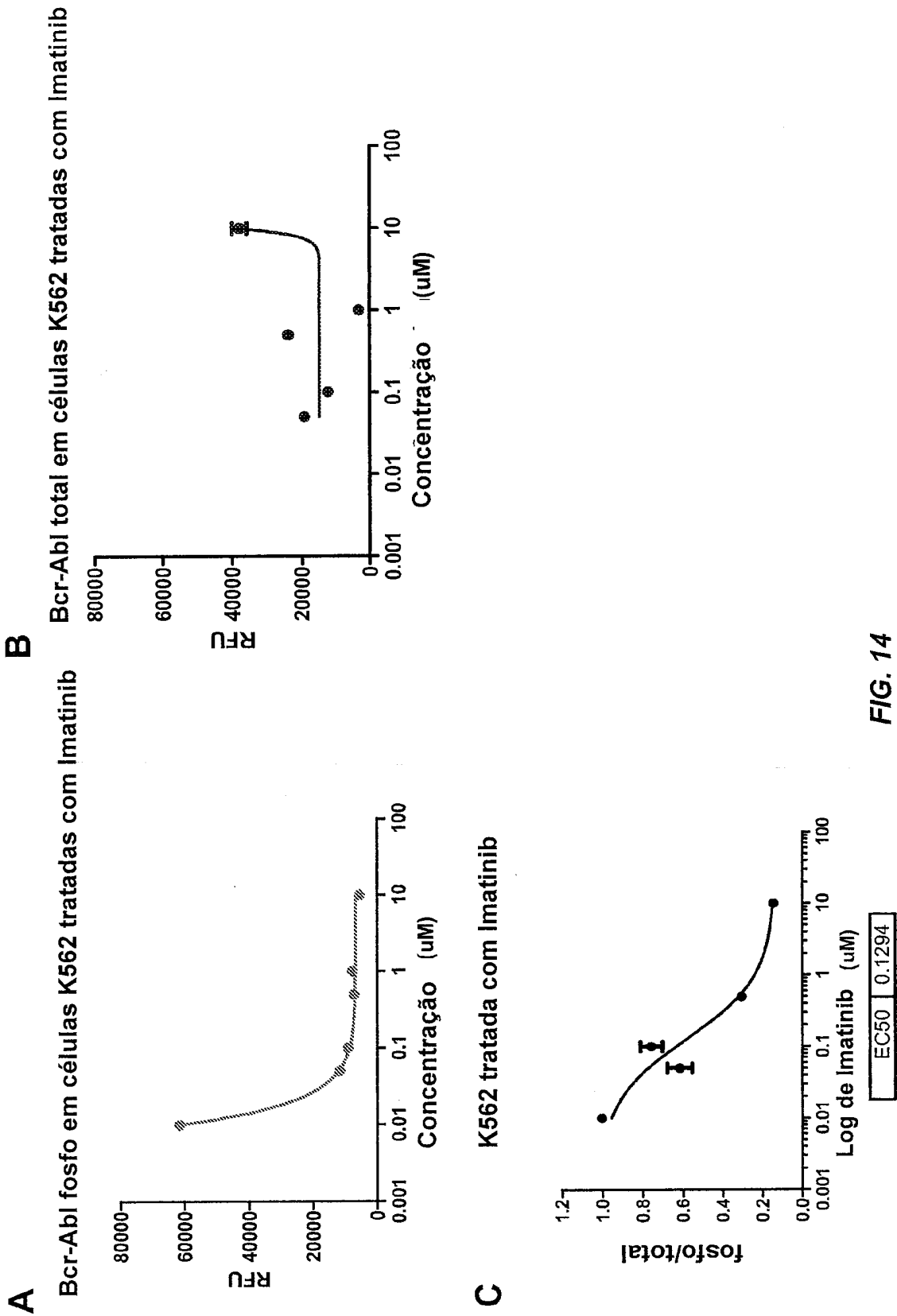


FIG. 14

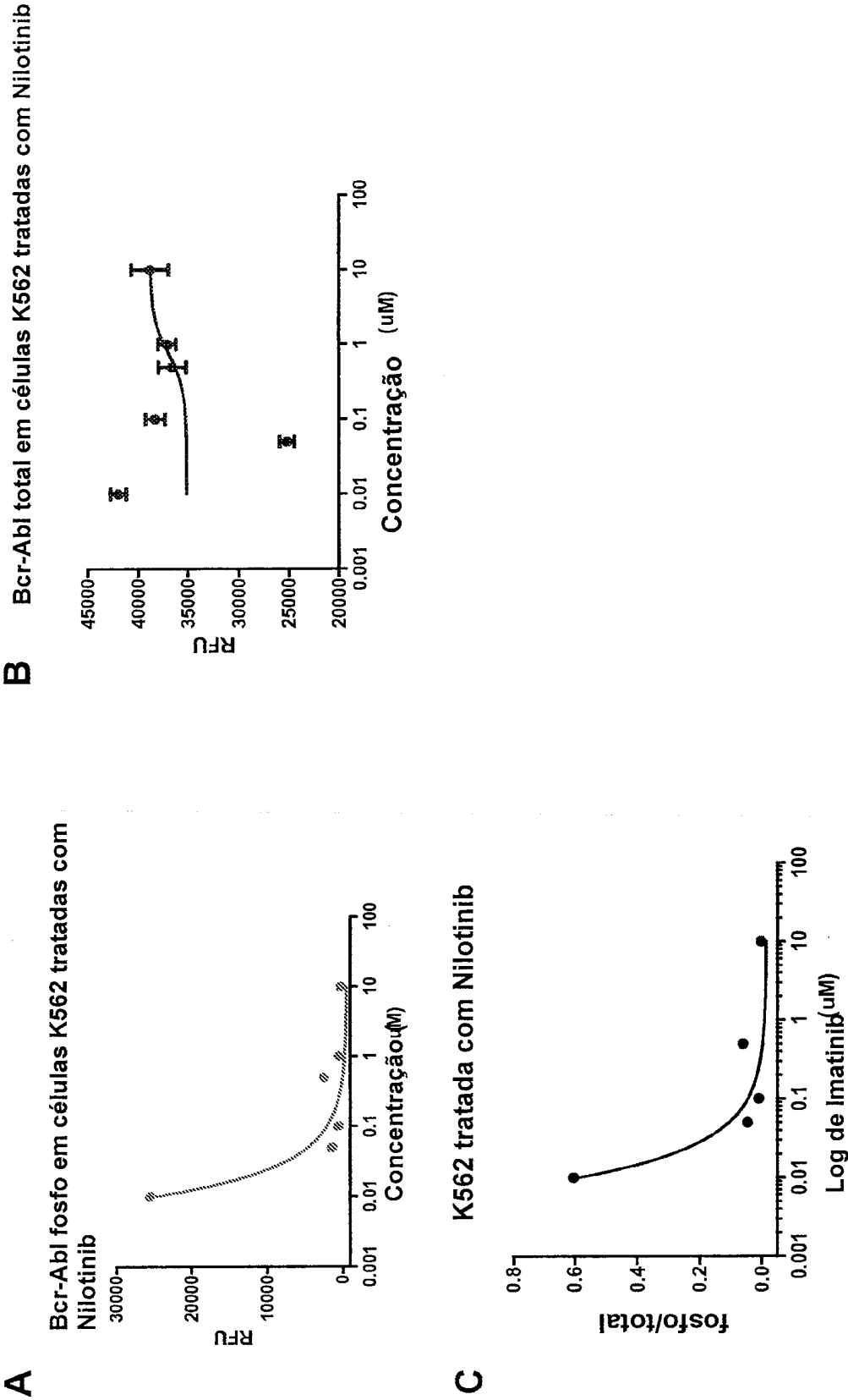


FIG. 15

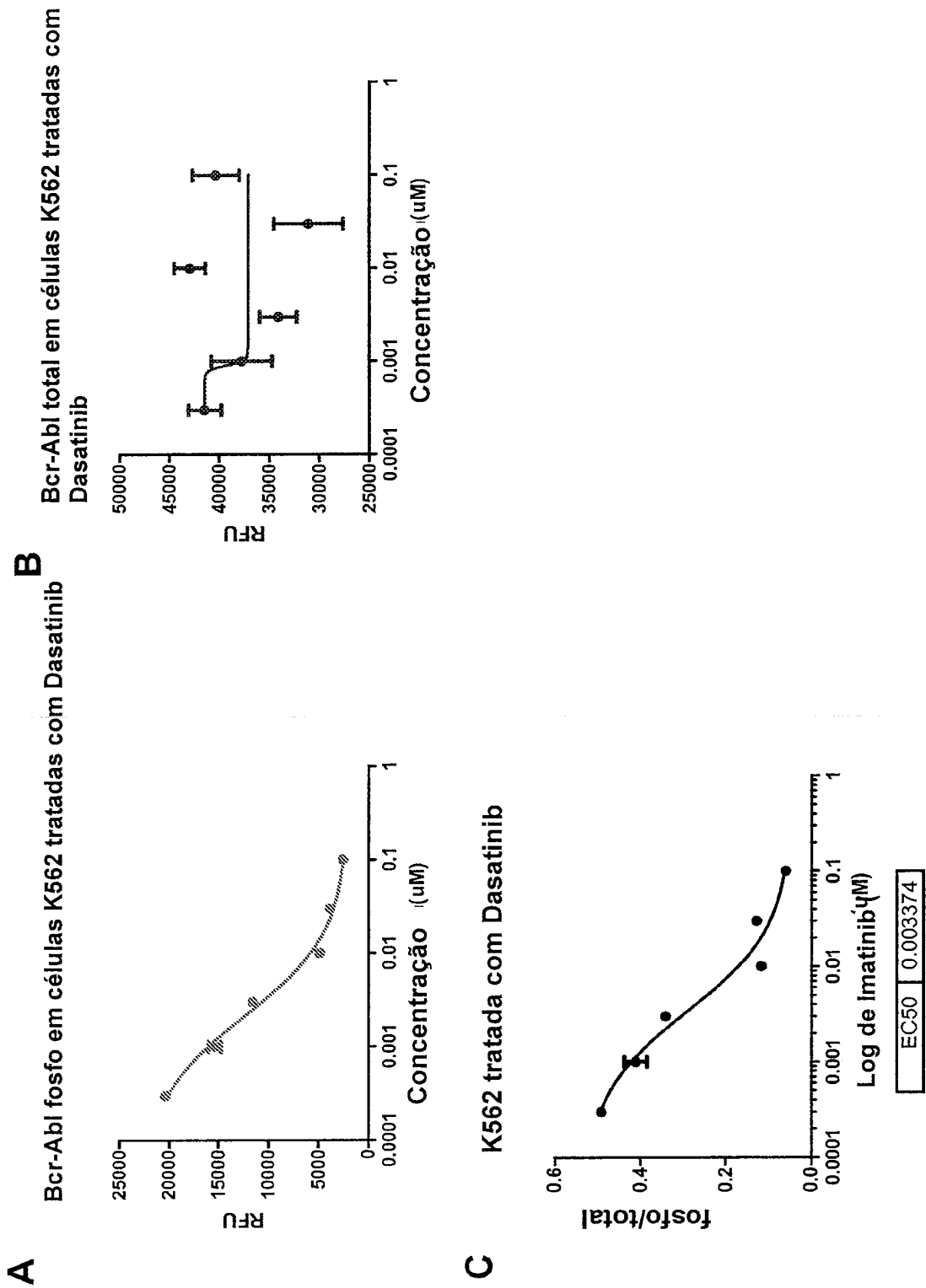
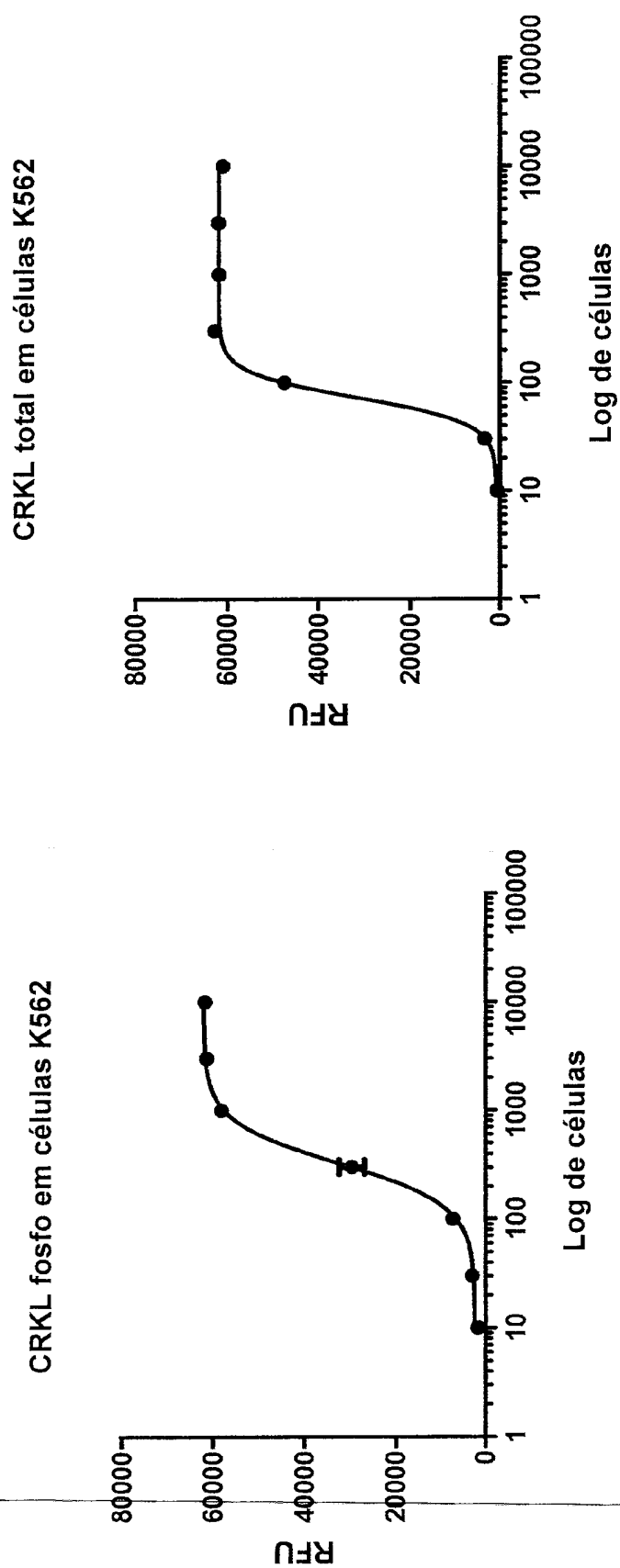


FIG. 16



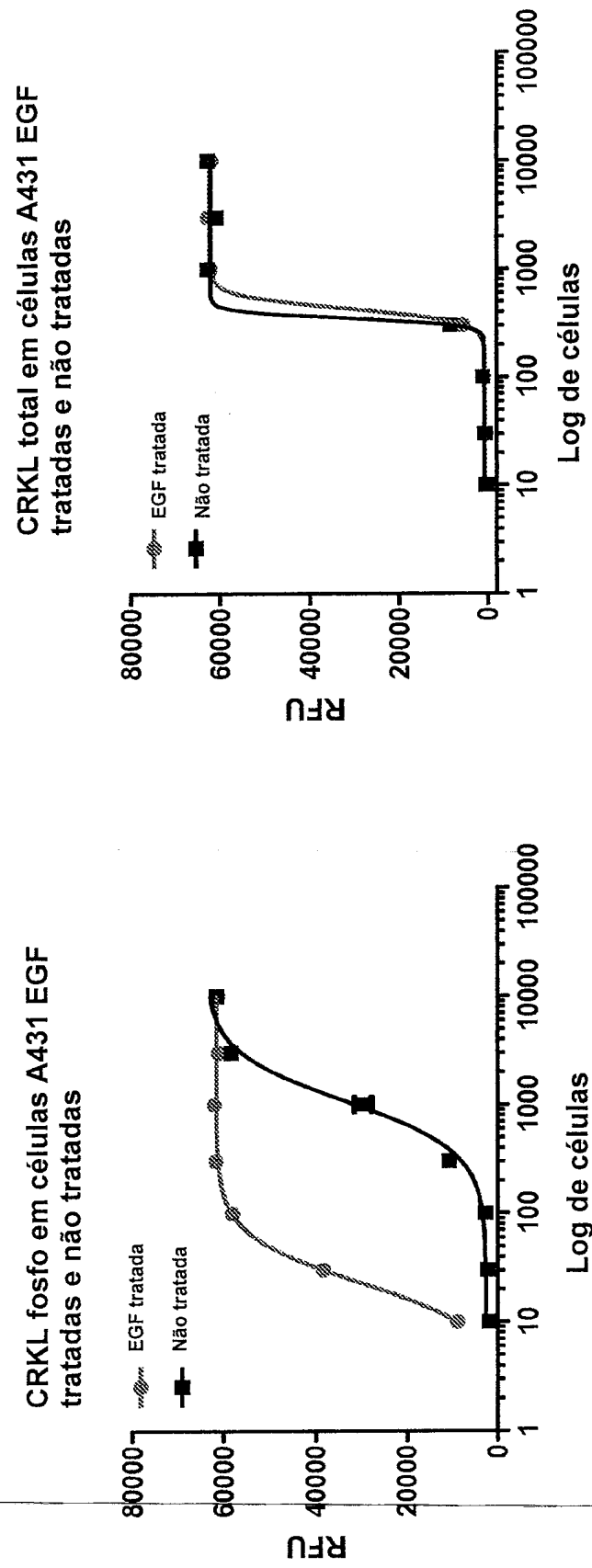


FIG. 18

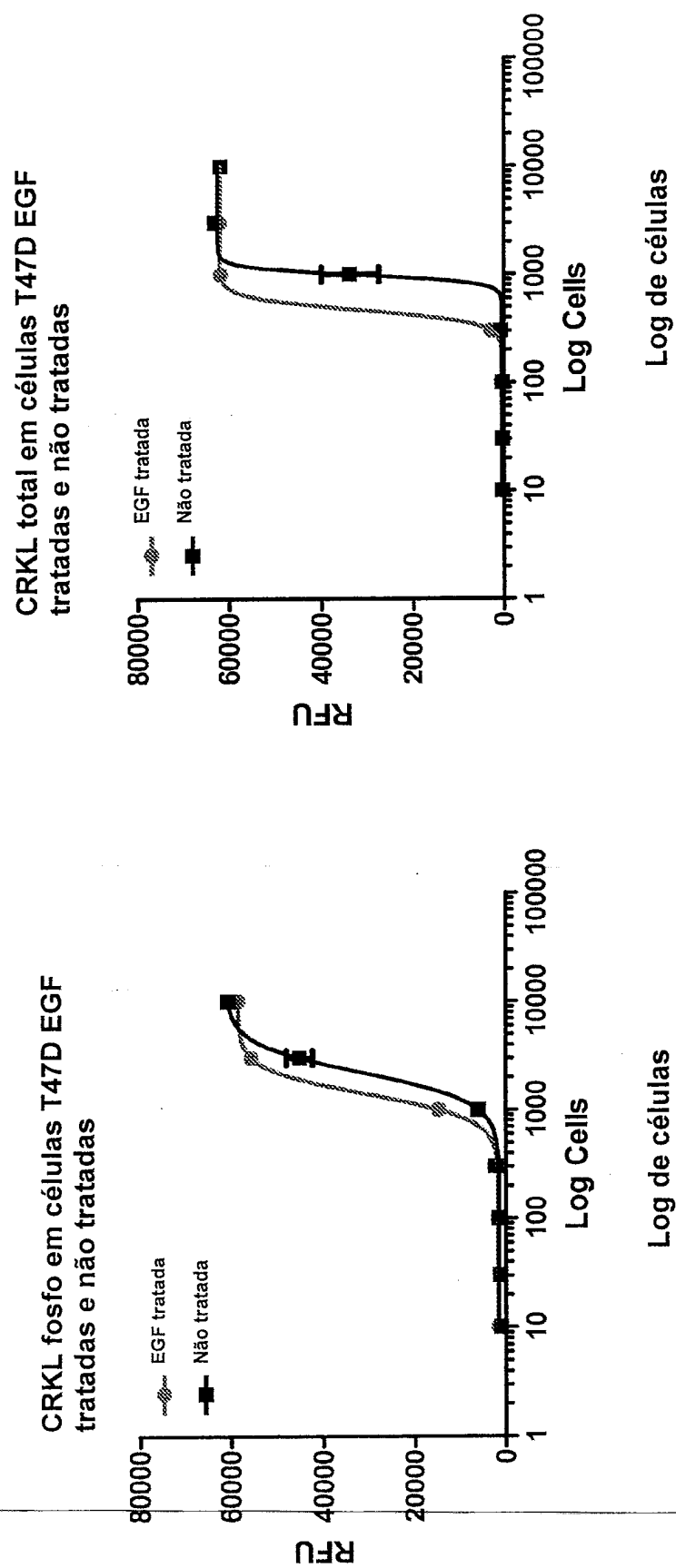


FIG. 19

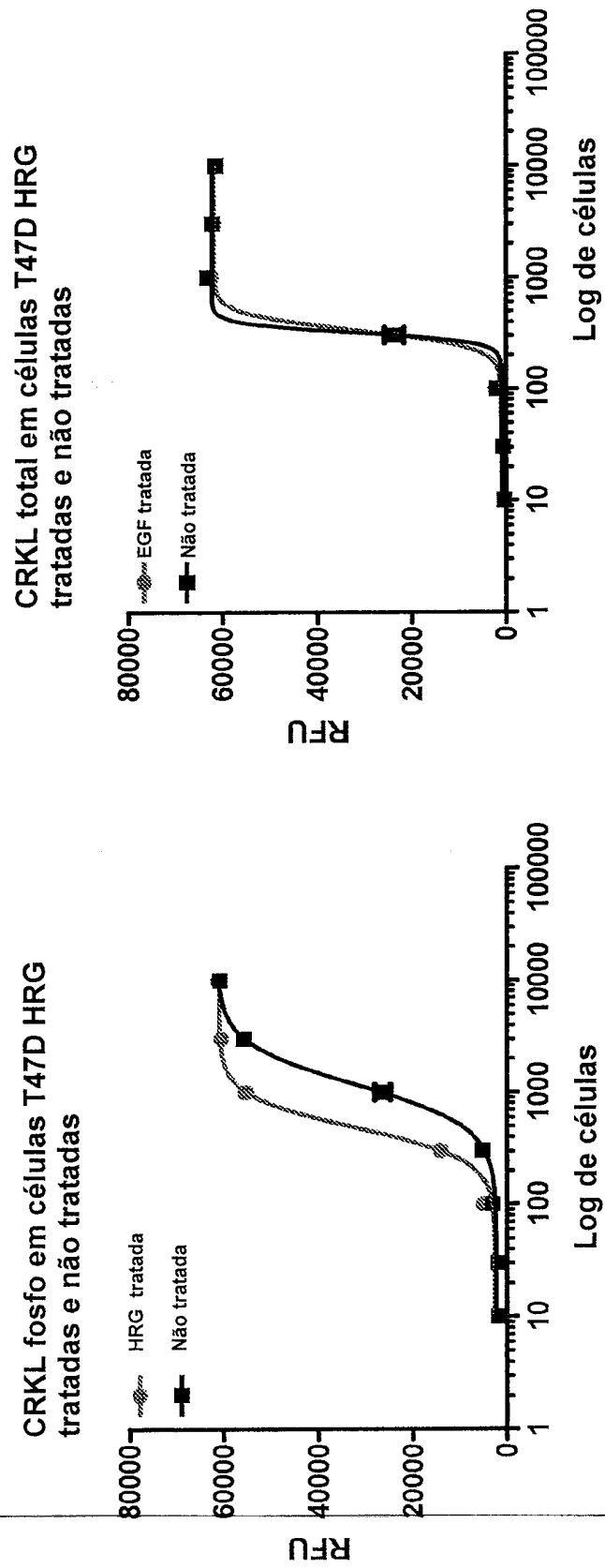


FIG. 20

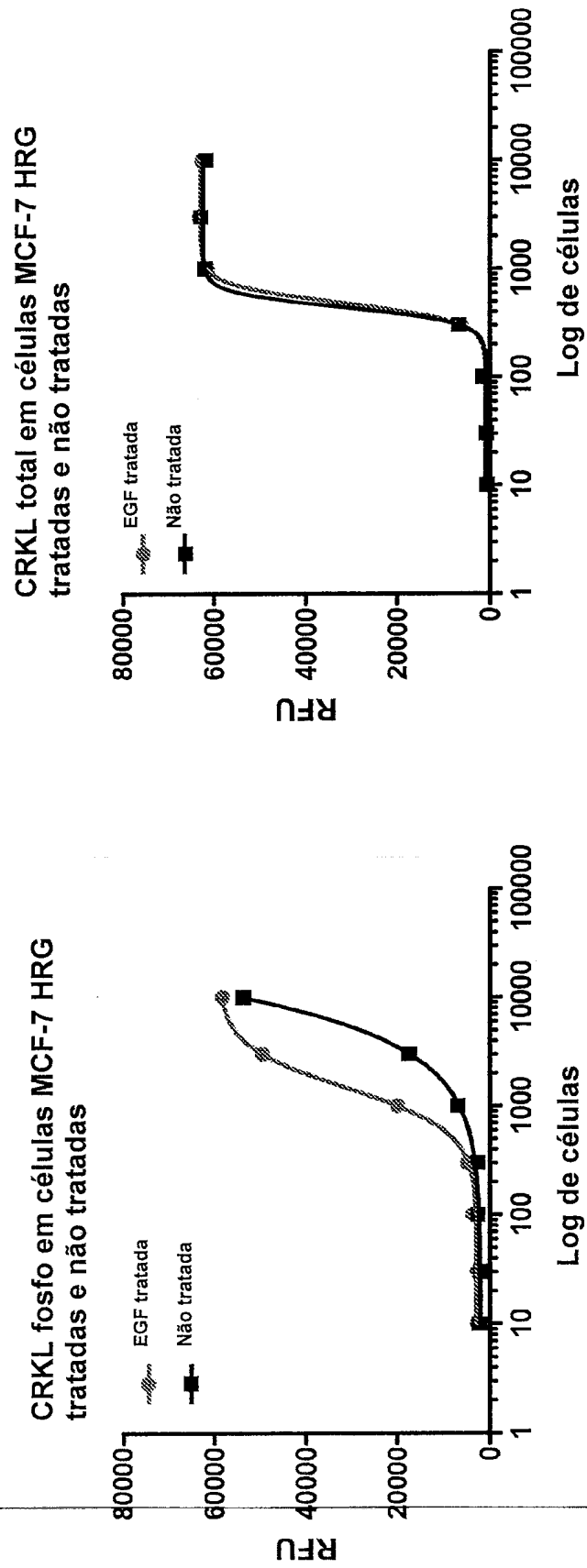


FIG. 21

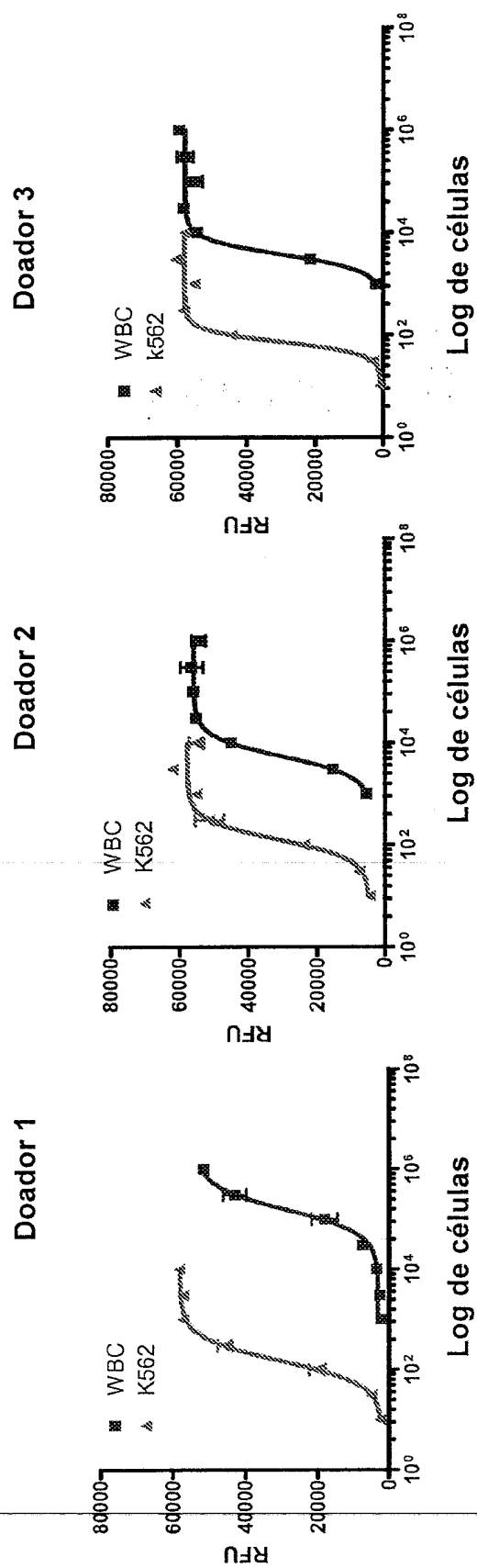


FIG. 22

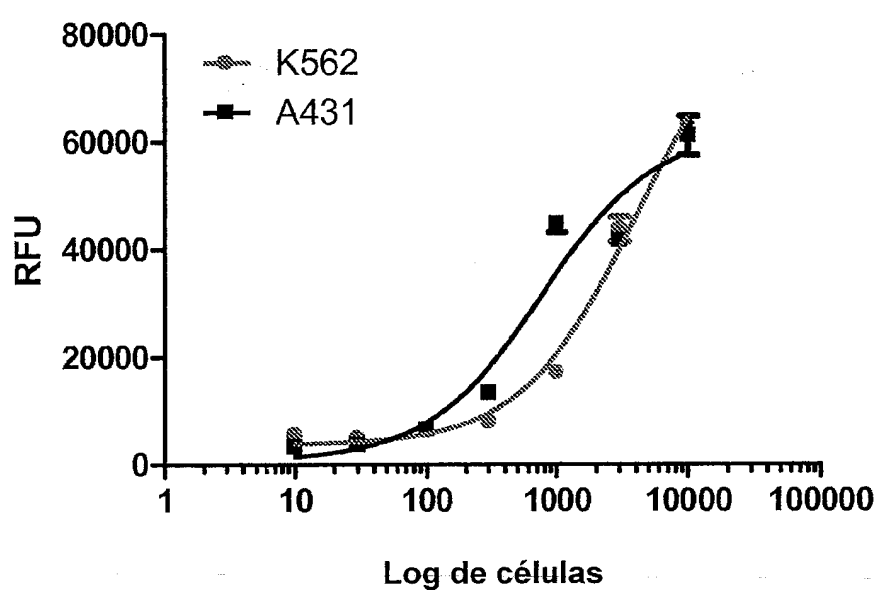


FIG. 23

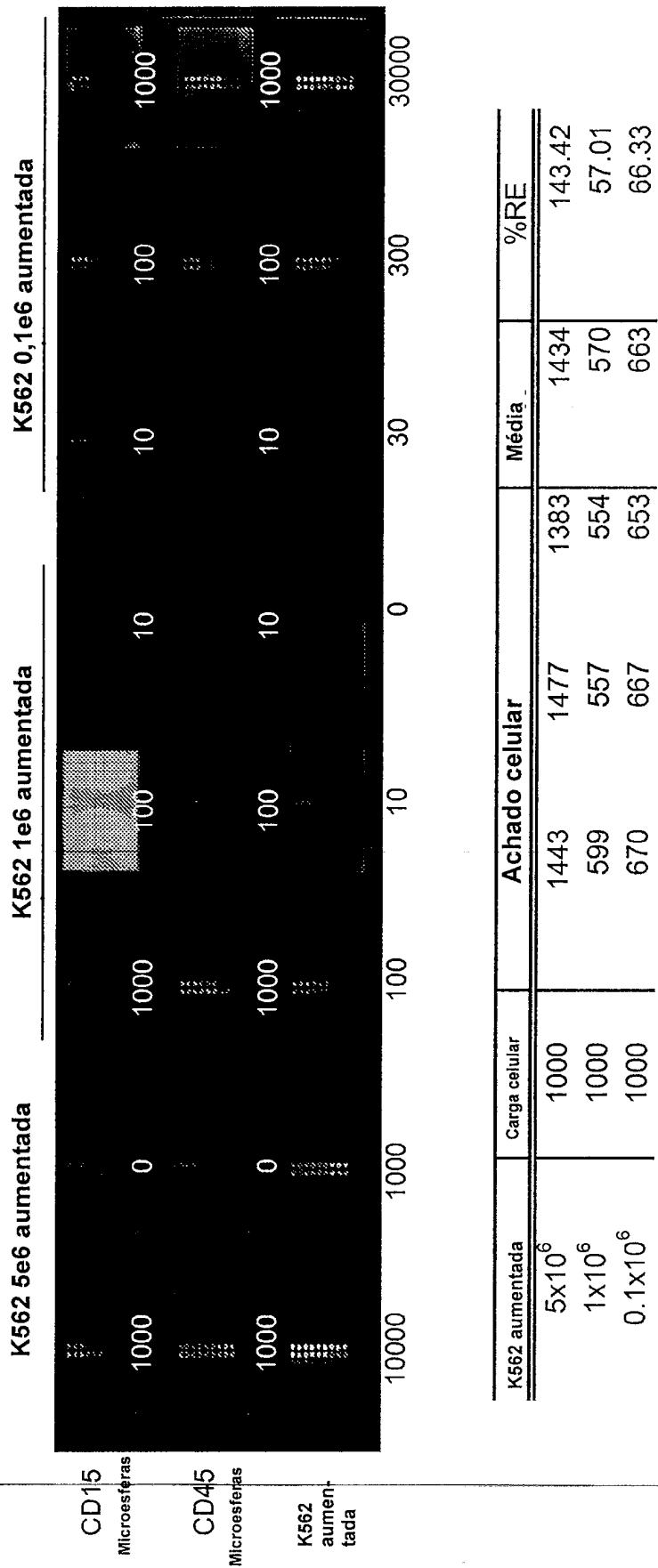
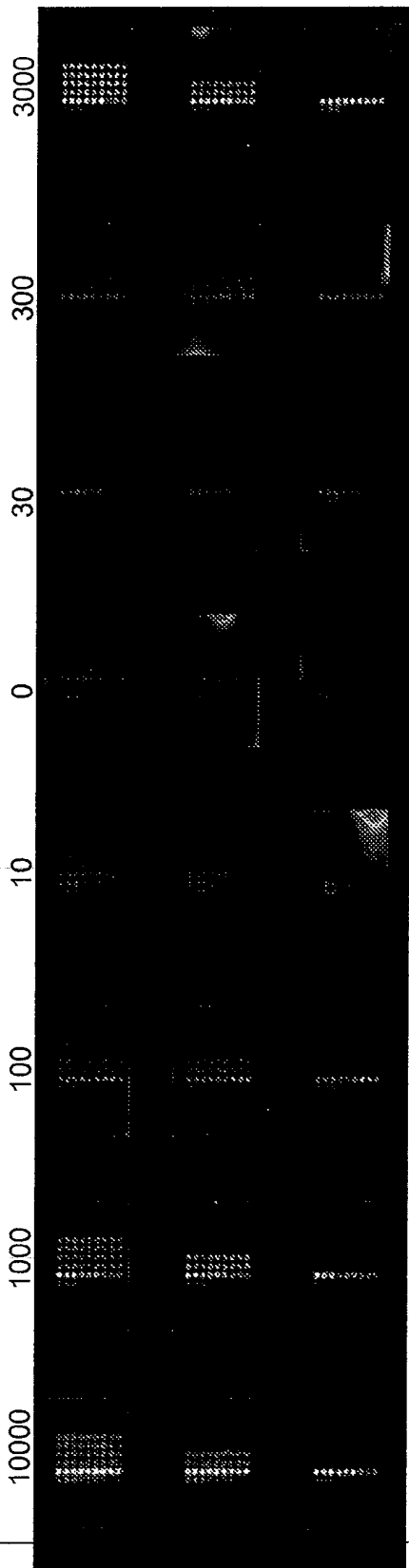


**FIG. 24**



Ab de captura: IgG, Bcr N-terminal, Bcr C-terminal, Bcr C-terminal, Bcr C-terminal

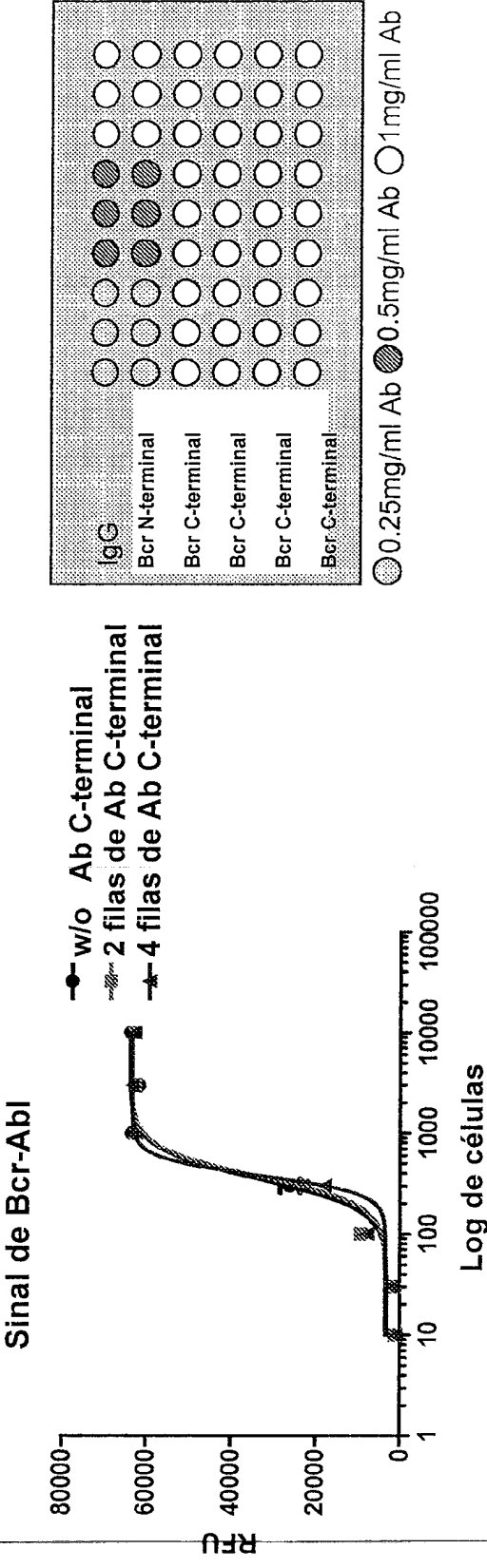


FIG. 25

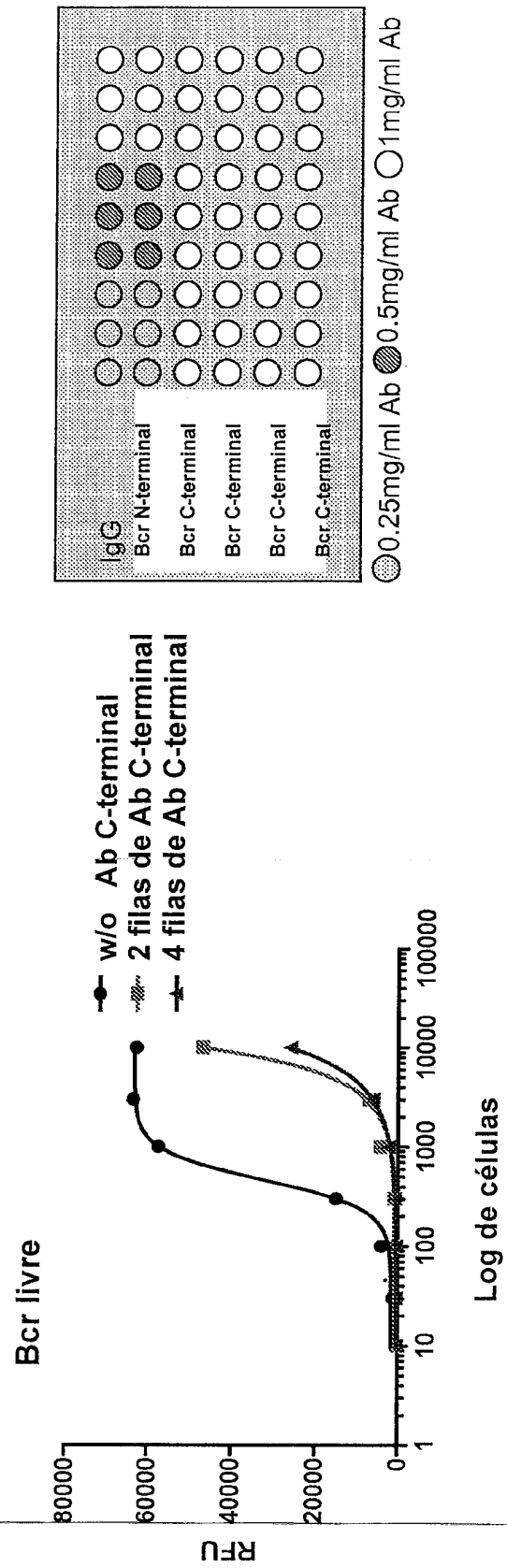
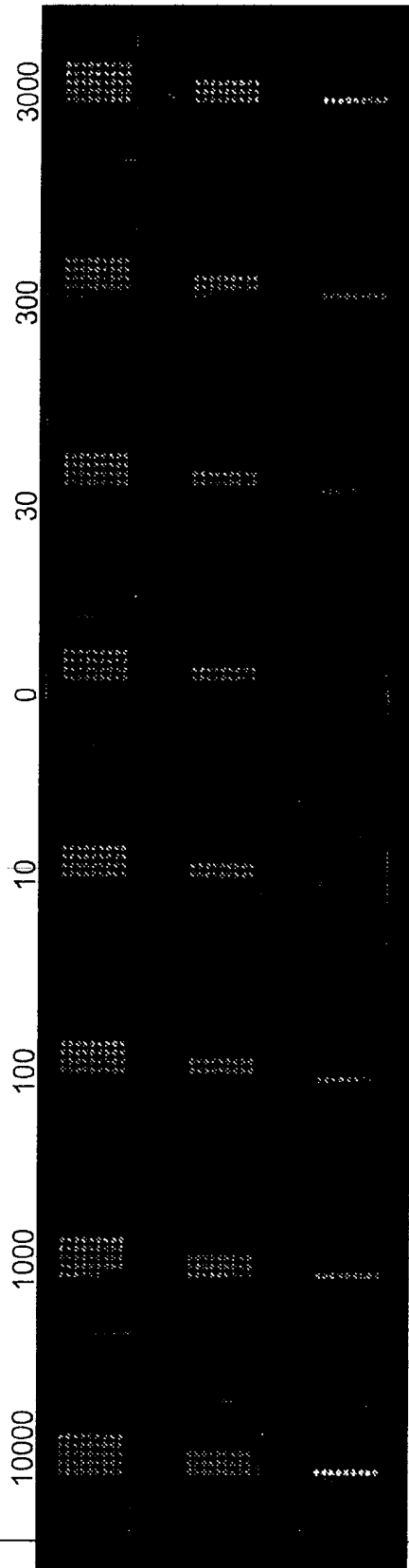


FIG. 26

RESUMO

“MÉTODOS PARA DETERMINAR O NÍVEL OU ESTADO DE ATIVAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO ONCOGÊNICA, PARA OTIMIZAR TERAPIA E/OU REDUZIR A TOXICIDADE EM UM SUJEITO TENDO CÂNCER, PARA SELECIONAR UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER ADEQUADO PARA O TRATAMENTO DE UM CÂNCER, PARA IDENTIFICAR A RESPOSTA DE UM CÂNCER AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER, PARA PREDIZER A RESPOSTA DE UM SUJEITO TENDO CÂNCER AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER, E, PARA DETERMINAR SE UM SUJEITO TENDO CÂNCER É RESISTENTE AO TRATAMENTO COM UM MEDICAMENTO ANTI-CÂNCER”

A presente invenção fornece arranjos a base de anticorpo para detectar o estado de ativação e/ou quantidade total de uma ou uma pluralidade de proteínas de fusão oncogênicas em uma amostra biológica, tal como sangue total ou tecido tumoral, e métodos de uso dos mesmos. Em certos exemplos, o estado de ativação e ou a quantidade total de proteína(s) de fusão oncogênica(s) presente(s) em uma amostra podem ser medidos em combinação com uma ou uma pluralidade de moléculas de transdução de sinal. As composições e métodos da presente invenção apresentam as vantagens de especificidade associada a ensaios imunoabsorventes ligados à enzima, sensibilidade associada a amplificação de sinal, e multiplexação de alto rendimento associada a microarranjos.